

米根霉发酵产 L-乳酸的中和剂研究及代谢通量分析

摘要

在米根霉发酵产 L-乳酸过程中，一般采用 CaCO_3 作为酸中和剂，不仅 L-乳酸损失大，且环境污染严重。为降低 L-乳酸生产成本，寻求替代 CaCO_3 的新型中和剂，本文通过摇瓶发酵优化得出以 CaCO_3 、 NaOH 溶液和氨水作为中和剂的最适培养基组成，通过罐发酵实验确定了 CaCO_3 、 NaOH 溶液和氨水的最适中和剂浓度，并在最适浓度基础上考察了米根霉的菌体形态和发酵动力学，实现了 NaOH 溶液和氨水作为中和剂的半连续发酵，同时对其进行代谢通量分析。主要研究结论如下：

1. 通过单因素和正交试验，优化得出采用 CaCO_3 、 NaOH 溶液和氨水作为中和剂时的培养基组成：（1）以 CaCO_3 作为中和剂的最优培养基组成：葡萄糖 120g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0g/L， KH_2PO_4 0.15g/L， NaH_2PO_4 0.20g/L， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35g/L。（2）以 NaOH 溶液作为中和剂的最优培养基组成：葡萄糖 120g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35g/L， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22g/L， NaH_2PO_4 0.10g/L， KH_2PO_4 0.15g/L。（3）以氨水作为中和剂的最优培养基组成：葡萄糖 120g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35g/L， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22g/L， NaH_2PO_4 0.15g/L， KH_2PO_4 0.15g/L。

2. NaOH 溶液和氨水作为中和剂时，添加 Ca^{2+} 后 L-乳酸产量平均提高 7.3 倍；通过罐发酵得出米根霉发酵产 L-乳酸的最适 pH 值为 5.5 ± 0.2 ， NaOH 溶液、氨水溶液作为中和剂的最佳浓度分别为 10mol/L、25%，通过摇瓶发酵试验得出 CaCO_3 最佳浓度为 60g/L；在最适 NaOH 溶液、氨水、 CaCO_3 浓度基础上进行罐发酵得菌丝体小球直径分别为 0.2-1.2mm、1.2-2.2mm、0.8-1.8mm，残糖分别为 2.58g/L、1.37g/L、22.78 g/L，L-乳酸产量分别为 74.34g/L、80.61g/L、75.80g/L，发酵强度分别为 1.03g/(L·h)、1.12g/(L·h)、1.40g/(L·h)；而使用 NaOH 溶液和 CaCO_3 复合中和剂、氨水和 CaCO_3 复合中和剂时发酵强度皆为 1.18 g/(L·h)，高于 NaOH 溶液、氨水的发酵强度，低于 CaCO_3 的发酵强度。

3. 在米根霉半连续发酵过程中，使用 NaOH 溶液作为中和剂时，L-乳酸平均发酵强度为 1.53 g/(L·h)，以氨水作为中和剂时，L-乳酸平均发酵强度为 1.65 g/(L·h)，高于分批发酵的产酸强度。

4. 简单构建了米根霉 As3.819 胞内代谢网络模型。应用代谢通量分析法，分别以 10mol/L NaOH 溶液、25% 氨水、60g/L CaCO_3 作为中和剂时不同发酵阶段胞内代谢通量分布的变化。以 NaOH 溶液为中和剂，第 12h、36h、60h 产物 L-乳酸的流量速率分别为 0.93mmol/g/h、2.05mmol/g/h 和 5.83mmol/g/h；以氨水为中和

剂时，第12h、36h、60h产物L-乳酸的流量速率分别为1.48mmol/g/h、2.02 mmol/g/h、5.94mmol/g/h；以CaCO₃作为中和剂，第12、30h、48h产物L-乳酸的流量速率分别是10.54mmol/g/h、4.72mmol/g/h、7.30mmol/g/h。

关键词：米根霉；L-乳酸；中和剂；半连续发酵；代谢通量分析

Study on neutralizers of L-lactic acid produced by *Rhizopus oryzae* and Metabolic Flux Analysis

Abstract

CaCO₃ was commonly used as an acid neutralizer in the process of producing L-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. CaSO₄ residue from the recovery procedure not only caused the loss of L-lactic acid during filtration but also brought enormous environmental pressures. Therefore, in order to reduce production cost, to seek a new neutralizer instead of CaCO₃, CaCO₃、NaOH solution and ammonia were researched respectively. The optimal medium composition of the three different neutralizers were optimized through fermenting by shake flasks; the optimal neutralizer concentration of CaCO₃、NaOH solution and ammonia were derived by tank fermentation, morphology of *Rhizopus oryzae* and fermentation kinetics were studied based on the optimal neutralizer concentration; Achieved the semi-continuous fermentation with NaOH solution and ammonia as the neutralizer, and made research based on metabolic flux analysis. The main findings were as follows:

1. The culture medium ingredient with CaCO₃、NaOH solution and ammonia as the neutralizer were optimized by the combination of single factor experiments and orthogonal experiments. (1) The optimal medium composition with CaCO₃ as the neutralizer: glucose 120g/L, (NH₄)₂SO₄ 4.0g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L, NaH₂PO₄ 0.15g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L, MgSO₄·7H₂O 0.35g/L, CaCO₃ 60g/L. (2) The optimal medium composition with NaOH solution as the neutralizer: glucose 120g/L, (NH₄)₂SO₄ 4.0g/L, MgSO₄·7H₂O 0.35g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L, NaH₂PO₄ 0.10g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L. (3) The optimal medium composition with ammonia as the neutralizer: glucose 120g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0g/L, MgSO₄·7H₂O 0.35g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L, NaH₂PO₄ 0.15g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L.

2. Effects of Ca²⁺ on L-lactic acid production were studied with NaOH solution and ammonia as the neutralizer. The results showed that after adding Ca²⁺, the average production of L-lactic acid was 7.3 times more than the control one; The optimum pH value of L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* was 5.5 ± 0.2, the optimal concentration of NaOH solution、ammonia as the neutralizer were 10mol/L、25% based on tank fermentation respectively, the optimum CaCO₃ adding amount was 60g/L based on shake flask fermentaton; fermentation on the optimum NaOH、ammonia、CaCO₃ concentration, the physical form of *Rhizopus oryzae* were

uniform pellet with diameter of 0.2-1.2mm、1.2-2.2 mm、0.8-1.8mm, residual sugar were 2.58g/L、1.37g/L、22.78g/L, L-lactic acid yields were 74.34g/L、0.61g/L、75.80g/L, fermentation intensity were 1.03g/(L•h)、1.12g/(L•h)、1.40g/(L•h); both of the fermentation intensity of NaOH solution and CaCO₃ composite neutralizer、ammonia and CaCO₃ composite neutralizer were 1.18g/(L•h), higher than the fermentation intensity of NaOH solution、ammonia but lower than fermentation intensity CaCO₃.

3. The semi-continuous fermentation using NaOH solution、ammonia as the neutralizer were studied. The results were as following: when using NaOH solution as the neutralizer, the average L-lactic fermentation intensity was 1.53g/(L•h), when the ammonia as the neutralizer, the average L-lactic fermentation was 1.65g/(L•h), higher than fermentation intensity of batch fermentation.

4. The intracellular metabolic network model of *Rhizopus oryzae* As3.819 was built through literature review and biochemical information of *Rhizopus oryzae* and experimental determination. Application of metabolic flux analysis, the changes of distribution in intracellular metabolic flux were researched with 10mol/LNaOH solution, 25% ammonia, 60g/L CaCO₃ as the neutralizer. The results showed that: the flow rate of L-lactic acid at 12h、36h、60h with NaOH solution as the neutralizer were 0.93mmol/g/h、2.05mmol/g/h and 5.83mmol/g/h respectively; the flow rate of L-lactic acid at 12h、36h、60h with ammonia as the neutralizer were 1.48mmol/g/h、2.02mmol/g/h、5.94mmol/g/h respectively; the flow rate of L-lactic acid at 12h、30h、54h with CaCO₃ as the neutralizer were 10.54mmol/g/h、4.72mmol/g/h、7.30mmol/g/h respectively.

Keywords: *Rhizopus oryzae*; L-lactic acid; neutralizer; semi-continuous fermentation; metabolic flux analysis

插图清单

图 1-1 乳酸的结构式	1
图 2-1 L-乳酸含量标准曲线	13
图 2-2 葡萄糖浓度对 L-乳酸产量的影响	16
图 2-3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	17
图 2-4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	18
图 2-5 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	18
图 2-6 KH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响	19
图 2-7 NaH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响	19
图 2-8 CaCl_2 浓度对产酸量的影响	21
图 2-9 CaCO_3 浓度对产酸量的影响	21
图 2-10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	22
图 2-11 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对 L-乳酸产量的影响	22
图 2-12 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	23
图 2-13 KH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响	23
图 2-14 NaH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响	24
图 2-15 CaCl_2 浓度对产酸量的影响	26
图 2-16 CaCO_3 浓度对产酸量的影响	26
图 2-17 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	27
图 2-18 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	27
图 2-19 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对 L-乳酸产量的影响	28
图 2-20 NaH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响	28
图 2-21 KH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响	29
图 3-1 还原糖含量标准曲线	34
图 3-2 NaOH 浓度对 L-乳酸产量的影响	36
图 3-3 氨水质量分数对 L-乳酸产量的影响	36
图 3-4 CaCO_3 添加量对 L-乳酸产量的影响	37
图 3-5 NaOH 、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 作为中和剂时的菌球形态	38
图 3-6 以 NaOH 作为中和剂的发酵动力学曲线	38
图 3-7 以氨水作为中和剂的发酵动力学曲线	39
图 3-8 以 CaCO_3 作为中和剂的发酵动力学曲线	40
图 3-9 NaOH 和 CaCO_3 复合中和剂的发酵动力学	40
图 3-10 氨水和 CaCO_3 复合中和剂的发酵动力学	41
图 3-11 以 NaOH 作为中和剂的半连续发酵	42
图 3-12 以氨水作为中和剂的半连续发酵	42
图 4-1 米根霉体内的代谢网络图	45

图 4-2 米根霉胞内主要代谢途径网络图	49
图 4-3 苹果酸标准曲线	50
图 4-4 富马酸标准曲线	51
图 4-5 以 NaOH 作为中和剂进行发酵的代谢通量分析	52
图 4-6 以氨水作为中和剂进行发酵的代谢通量分析	53
图 4-7 以 CaCO ₃ 作为中和剂进行发酵的代谢通量分析	54

表格清单

表 1-1 乳酸异构体的理化性质	2
表 1-2 L-乳酸及衍生物在食品工业中的应用	4
表 2-1 正交试验因素水平表	14
表 2-2 正交试验因素水平表	15
表 2-3 正交试验因素水平表	16
表 2-4 $L_{18}(3^7)$ 正交实验方案及实验结果分析	20
表 2-5 方差分析表	20
表 2-6 $L_{16}(4^5)$ 正交实验方案及实验结果分析	24
表 2-7 方差分析表	25
表 2-8 $L_9(3^4)$ 正交实验方案及实验结果分析	29
表 2-9 方差分析表	30
表 3-1 pH 值对菌体形态和产酸量的影响	35
表 3-2 不同中和剂对菌体形态的影响	38
表 4-1 米根霉胞内代谢反应方程	45

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标志和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得合肥工业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签字：张乃兰

签字日期：2010年4月26日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解合肥工业大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅或借阅。本人授权合肥工业大学可以将学位论文的全部或部分论文内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文者签名：张乃兰

导师签名：



签字日期：2010年4月26日

签字日期： 年 月 日

2010年4月27日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：

致 谢

本研究论文是在姜绍通教授悉心指导下完成的。在两年半的攻读学位期间，姜绍通教授作为我的导师，他以严谨的治学态度和开阔的学术视野逐步引导我去探求学问和克服困难，对我的科研能力的提高起到了十分重要的作用，同时在生活上给我的无私关怀让我深切的感受到为人师长的辛劳和为人学子的幸福。导师不仅教导我做学问更教导我如何做人，让我受益非浅，在谨记导师的教诲的同时，我只有用加倍的努力来表达对导师的敬意。

感谢潘丽军教授、郑志老师、罗水忠老师、李兴江老师、陈晓燕老师、王华林老师、庞敏老师、吴学凤博士、刘模师兄给我的指导和帮助；感谢刘靖师兄、胡燕红师姐、研三的兄弟姐妹们以及师弟师妹们给我的帮助。

最后，特别感谢我的父母对我的养育之恩，感谢我的哥哥嫂嫂一直以来对我的支持与帮助，家人的支持永远是我动力的源泉。

作者：张巧兰

2010年4月22日

表 1-1 乳酸异构体的理化性质

Table 1-1 The physical and chemical characters of lactic acid isomer

构型	熔点/℃	比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$	解离常数(25℃)	熔化热/(kJ/mol)
L	25-26	+3.3°	1.37×10^{-4}	16.87
D	25-26	-3.3°	1.37×10^{-4}	16.87
LD	18	0	1.37×10^{-4}	11.35

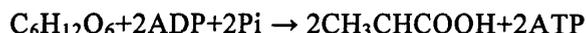
1.2 乳酸的生产方法

1.2.1 发酵法

发酵法制备乳酸是以淀粉、葡萄糖等糖类或牛乳为原料，经微生物发酵而制得。按微生物发酵糖类经由的过程和生成产物的不同，可将乳酸发酵分为同型乳酸发酵（Homofermentation）、异型乳酸发酵（Heterofermentation）和混合酸发酵（Mixed acid fermentation）^[1]。

A 同型乳酸发酵

微生物通过EMP代谢途径进行同型乳酸发酵，乳酸是代谢的惟一产物。1mol葡萄糖可以生成2mol乳酸，理论转换率为100%。但由于发酵过程中微生物有其他生理活动存在，实际转化率一般在80%以上者即视为同型乳酸发酵，总反应式为：



B 异型乳酸发酵

微生物经由Bifidus途径和PK途径生成等摩尔数的乳酸、CO₂和乙醇。葡萄糖的转化率只有50%，总反应式为：



C 混合酸发酵

同型乳酸发酵是在特殊情况下，如葡萄糖浓度受到限制、pH升高或温度降低而发生的一种乳酸发酵机制，葡萄糖经EMP途径生成丙酮酸，但丙酮酸的代谢途径发生了改变，除生成乳酸外，还生成了甲酸等副产物。传统意义上的乳酸发酵类型是针对乳酸细菌而言的，是在厌氧或兼性厌氧条件下合成乳酸的。而米根霉作为好氧菌，其乳酸发酵具有独特的代谢途径。它是经EMP途径生成丙酮酸，然后一部分丙酮酸进入TCA循环，而另一部分丙酮酸在乳酸脱氢酶、丙酮酸脱羧酶和丙酮酸羧化酶的催化下分别生成乳酸、乙醇、苹果酸和富马酸。依据形成产物情况，该发酵也属于混合酸发酵类型^[4-5]。

1.2.2 化学合成法

1963年，美国Monsanto公司开始采用化学合成法生产乳酸^[6]。化学合成法生产乳酸可通过多种途径进行，其中具有现实意义的是乳腈法。该法是乙醛与氢氰酸经碱性催化剂作用生成乳腈，这是一个液相反应，在常压下进行，粗乳

腈通过蒸馏回收纯化并用浓盐酸或硫酸水解为乳酸，还产生相应的氨基酸副产物，粗乳酸用甲醇酯化得乳酸甲酯，精馏后再水解生成乳酸与甲醇，甲醇可再循环利用^[7]。乳酸的其它一些可行的化学合成法包括糖的碱性催化水解、丙烯乙二醇氧化、乙二醇的硝酸氧化等。

1.2.3 酶法

A 2-氯丙酸酶法转化

日本东京大学的木崎等^[8]研究了用酶法生产乳酸，分别从恶臭假单孢菌和假单孢菌113细胞中纯化出L-2-卤代酸脱卤酶（简称为L-酶）和DL-2-卤代酸脱卤酶（简称为DL酶），使之作用于底物DL-2-氯丙酸，就可得到L-乳酸或D-乳酸。

B 丙酮酸酶法转化

Hummel等^[1]从D-乳酸脱氢酶活力最高的混乱乳杆菌DSM20196菌体中得到D-乳酸脱氢酶，然后以无旋光性的丙酮酸为底物得到D-乳酸。

1.2.4 乳酸生产方法的比较

化学合成法的缺点是产品为外消旋乳酸即DL-乳酸，另外，由于合成法所用的原料是乙醛和剧毒物氢氰酸，尽管美国食品和药物管理局（FDA）已将合成乳酸列为安全品，但许多人还是对化学合成法生产的乳酸的安全性表示担心，因而合成法生产乳酸大大受到限制，此外其生产成本也较高。酶法生产乳酸虽可专一性地得到旋光乳酸，但工艺比较复杂，应用到工业上还有待于进一步研究。

微生物发酵法生产乳酸，可通过菌种和培养条件的选择而获得具有立体专一性的D-乳酸或L-乳酸或是两种异构体以一定比例混合的外消旋体，以满足生产聚乳酸的需要。另外发酵法生产乳酸除能以葡萄糖、乳糖等单糖为原料外，还能以淀粉、纤维素为原料发酵生产乳酸，利用这些可再生资源生产不会导致大气中的二氧化碳的净增加，也就不会引起温室效应。因此，微生物发酵法生产乳酸因其原料来源广泛，生产成本低、产品光学纯度高、安全性高等优点而成为生产乳酸的重要方法^[9]。

1.3 L-乳酸的应用

L-乳酸是一种天然存在的有机酸，广泛存在人体、动物、植物和微生物中，是世界公认的三大有机酸之一，其应用极为广泛^[10]。

1.3.1 食品工业中的应用

由于L-乳酸对人体无副作用，易吸收，可直接参与体内代谢，酸性柔和且稳定，有助于保护食品的口味，因此L-乳酸及其衍生物已逐渐取代其它有机酸，作为酸味剂、杀菌剂、乳化剂、保鲜剂等广泛应用于食品工业^[11]，见表1-2。在罐头、酱菜、饮料生产中加入L-乳酸以替代对人体健康有毒害作用的苯甲酸钠，在啤酒生产过程中，用L-乳酸代替磷酸来调节pH值。此外加入少量的L-乳

酸既可以抑制杂菌的生长又能促进糖化完成，还具有保鲜作用，有利于食品卫生^[12]。

表 1-2 L-乳酸及衍生物在食品工业中的应用

Table 1-2 Application of L-lactic acid and its derivative in food industry

名称	用途
L-乳酸	酸味剂、防腐剂、啤酒pH调节剂、杀菌剂、保鲜剂
L-乳酸钙	风味增强剂、固化剂、膨松剂、营养补充剂、稳定剂
L-乳酸亚铁	营养补充剂、婴儿配制食品
L-乳酸钾	风味增强剂、调味剂、保温剂、pH控制剂
L-乳酸钠	调味剂、保湿剂、乳化剂、防腐剂、防冻剂
硬脂酰乳酸钙	面团增强剂、蛋制品起泡剂
硬脂酰乳酸钠	乳化剂、稳定剂、组织柔软剂
硬脂酰乳酸酯	乳化剂、增塑剂、表面活性剂
甘油混合酯	乳化剂、增塑剂、表面活性剂
脂肪酸甘油乳酰酯	乳化剂、增塑剂、表面活性剂
L-乳酸酯	溶剂、香料

1.3.2 在医药工业中的应用

由于L-乳酸有很强的杀菌作用，其杀菌能力是柠檬酸、酒石酸、琥珀酸的几倍，可以直接用作手术室、病房、实验室、车间等场所的消毒剂^[13]；L-乳酸钙、L-乳酸铁、L-乳酸钠是补充金属元素的良好药品；L-乳酸经过聚合可生成直链或环状的聚乳酸。聚L-乳酸系无毒的高分子化合物，具有生物相容性。在体内能被分解成L-乳酸而被人体代谢，不引起变态反应。还可用于制造缓释胶囊制剂（使血液中药物浓度相对降低，在治疗癌症方面已取得可喜进展）、生物降解纤维（制成手术缝合线）、生物植片（修复骨折或其它机体损伤）等医药领域^[14-15]。

1.3.3 在农业方面的应用

在农业生产中，低分子量聚L-乳酸可作为缓释材料（生产缓释肥料、农药），或作为可降解农用薄膜在农业生产中具有广泛应用^[16-17]。另外L-乳酸还可作为植物生长活力剂，水产用生菌剂等应用于农、渔业上，具有十分诱人的开发前景。聚L-乳酸与其它材料共聚制成的生物降解塑料，可以用作生产缓释农药，延长农药的作用时间，对农作物和土壤无毒害作用，提高农药的使用效率^[18-19]。

1.3.4 在化学工业方面的应用

聚L-乳酸（PLA）是无毒高分子化合物，具有生物相容性，可生物降解吸收，强度高，易加工成型^[20]。它易被自然界中的各种微生物或动植物体内的酶分解，最终形成二氧化碳和水，不污染环境因而被认为是最有前途的可生物降解高分子材料^[19-20]。聚L-乳酸由于其具有与聚苯乙烯相似的光泽度、加工性能

及生物可降解性，可广泛用于降解塑料及绿色包装材料的生产^[21]。在美国和日本，聚L-乳酸已用于纸涂层、透明塑料容器、发泡容器、薄膜、餐馆容器、儿童玩具、蔬菜包装等，今后将在纤维、农业、垃圾（堆肥化）等方面进行新的开拓。

L-乳酸在可生物降解塑料方面的应用，对于减少“白色污染”，实现可持续发展战略具有极其重要的意义。据国外资料预计，不久的将来将有数百万吨级的塑料被聚L-乳酸所取代^[22]。

1.4 国内外发酵生产L-乳酸的研究现状

1780年瑞典化学家Scheele最早在酸牛乳中提炼制得乳酸。1875年，巴斯德发现使乳变酸的乳酸菌。在食品的发酵过程中如乳酪、香肠、泡菜的加工制造过程中使用乳酸和大规模生产乳酸要追溯到1881年的美国。1899年，Boullanger申请了由乳酸霉即现在的根霉（*Rhizopus*）或毛霉（*Mucor*）生产乳酸的专利。1911年，斋藤确定根霉所产乳酸为L-型^[23-25]。L-乳酸发酵于上世纪50年代至60年代在生物化学方面取得了较大的进展，通过遗传工程改良乳酸生产菌也开始起步。

自然界中可产生乳酸的微生物很多，但产酸能力强、可以应用到工业的只有两大类，一类为乳酸菌（*Lactic acid bacteria*），另一类为根霉（*Rhizopus oryzae*）。根霉所产的乳酸光学纯度好，但是产酸量低，需氧，耗能高；乳酸菌产酸量高，厌氧，好能低，但是产物含有部分D-乳酸。目前用于L-乳酸发酵生产研究的菌种，主要是米根霉，乳杆菌和乳酸链球菌^[17]。米根霉生长因对营养要求低，可以直接利用淀粉转化为L-乳酸而被广泛采用。

1.4.1 米根霉菌种选育方面的研究

菌种的优良直接关系到发酵过程的控制及其产量，是发酵过程中一个至关重要的影响因素。目前以米根霉为亲本的优良菌株的选育有：

（1）高产菌株的筛选：江苏微生物研究所曹本昌等人^[26]选育了一种产L-乳酸的米根霉菌株JSMI-R73并对该菌的性能及影响产酸的条件进行了研究，用500L发酵罐进行扩大试验，当玉米粉质量分数为12%时产酸70g/L以上，20%时产105g/L以上，其中L-乳酸纯度最高可达99%。杨虹等人^[27]利用淀粉—酸性培养基富集培养，并结合高锰酸钾-溴化钾平板检出的方法从土壤中筛选出产L-乳酸81g/L的根霉R-2菌株，以其为出发菌株经紫外线诱变从琥珀酸平板上获得了变异株R-291，以葡萄糖为碳源，其L-乳酸产率为103g/L，对糖转化率为68.9%。虞东胜等人^[28]从78株米根霉中筛选出13株产L-乳酸较高的菌株，其中米根霉Rs928产L-乳酸最高，以葡萄糖为碳源，在60t发酵罐中，当总糖平均浓度为174g/L时，发酵61h产L-乳酸140g/L，糖转化率为80.4%，L-乳酸纯度为97.9%。白冬梅等人^[29,30]利用酸性馒头片富集培养，用含脱氧胆酸钠和溴甲酚绿平板检出的方法从土壤中选出了根霉菌*R.oryzae*3017。同时利用UV、硫酸二乙酯、⁶⁰Co

对菌株*R.oryzae*3017进行了诱变选育,得到突变株R.1021。

(2) 利用基因工程技术得到高产的目的工程菌株: Obaysh^[31]在1966年首次报道了在米根霉中存在NAD⁺依赖型的乳酸脱氢酶。Pritchard^[32-33]在1971年相继对米根霉NAD⁺依赖型的乳酸脱氢酶进行研究,指出该酶只以L-乳酸作为底物,且胞外最适pH7.2,较高的葡萄糖浓度对它的表达有诱导作用,同时使酶维持较高的活性。Skory^[34]在2000年公布了关于米根霉中乳酸脱氢酶的编码基因和分离与表达的研究,结果表明米根霉中至少存在两种乳酸脱氢酶:NAD⁺依赖型乳酸脱氢酶LDHA和LDHB分别由ldha和ldhb编码,2001年Erdogan^[35]利用RT-PCR手段对米根霉的乳酸脱氢酶的基因片断进行扩增,Skory^[36-37]在2003年首次将米根霉的乳酸脱氢酶基因在酵母菌中表达,其后又通过提高乳酸脱氢酶活性来提高米根霉的产酸能力,其中带有较长基因片断的质粒明显比带较短基因片断质粒的产酸量高。

尽管基因工程实现了有目的、有控制的菌株选育,但目前关于插入的DNA片断在米根霉菌株中是如何结合与复制的还不清楚,在如何选择最佳质粒载体等方面也还有待进一步的研究^[38]。

1.4.2 米根霉发酵产L-乳酸的研究现状

L-乳酸的发酵是起步较早、发展较成熟的一种有机酸发酵。近几年对米根霉发酵产L-乳酸的发酵工艺研究主要集中在发酵原料的选择、菌体形态和发酵条件的优化等方面^[39]。乔长晟等人^[40]运用正交试验理论,对L-乳酸高产突变株NAF-032的发酵条件进行了初步研究,优化了发酵培养基。白冬梅等人^[41-42]以米根霉R1021为菌株进行研究,发现菌丝呈菌球状比块状产酸率高;发酵8h后,添加CaCO₃可以得到均匀的菌球(直径1.0-2.0mm);当孢子密度在3×10⁶个/mL时,菌球较均匀。

L-乳酸发酵过程中,由于不断生成L-乳酸使发酵液pH逐渐降低,较低的pH值对菌体正常生长和产酸过程会产生强烈的抑制,因此必须添加酸中和剂进行pH的调控^[43]。

CaCO₃是目前普遍使用的酸中和剂^[44]。使用CaCO₃为中和剂作用温和,不会对细胞造成损伤,有利于菌体生长;且CaCO₃能够一次性投加,在进行摇瓶发酵试验时简单方便^[45]。同时Ca²⁺在菌体的生长和菌球的形成过程中起重要作用,发酵液中存在的Ca²⁺通过作用于细胞中的钙调素参与菌丝顶端生长的极性和菌丝分支形成的控制^[46],另外, Ca²⁺还可以通过与细胞原生质膜相结合生成新的cAMP结合位点而强化糖降解过程^[47]。但采用CaCO₃作为米根霉发酵生产L-乳酸中和剂时,当发酵糖浓度高于120g/L,在发酵中后期的发酵液中,高浓度的乳酸钙使发酵液变得粘稠,形成高泡沫,影响发酵罐中的供氧水平,降低产酸速率并形成杂酸;或者容易使发酵液固化,使发酵难以继续。为了提高溶氧水平,常提高搅拌速度或提高通气量,这样不仅增加能耗,而且容易造成跑

料现象，增加染菌机会。此外，在乳酸后续的分离提取中产生的大量石膏废渣不仅在过滤时造成较大的乳酸损失，而且由于废渣不易处理，对L-乳酸万吨级规模的生产将形成巨大的环保压力和废渣处理成本，不利于L-乳酸生产成本的降低，严重阻碍大规模乳酸生产的可持续化发展。因此，采用发酵新工艺，代替CaCO₃中和剂的研究具有十分重要的现实意义^[48-49]。

目前一般利用氨水、NaOH溶液、KOH溶液、Ca(OH)₂等代替CaCO₃来调节发酵液的pH。江苏省微生物研究所的匡群、孙梅^[48]等采用氨水作为中和剂，用筛选得到的一株米根霉*Rhizopus oryzae* JS-N02-02进行以氨水为中和剂的发酵试验，自动发酵罐连续5批发酵，平均总糖浓度为136.8g/L，平均产酸达100.6g/L，L-乳酸纯度达95.3%，糖酸转化率达71.6%。白冬梅^[50]等以流加NaOH作为中和剂，控制pH值为4.0±0.1，产酸71.65g/L。Shigemobu^[51-52]等通过使用亚硝基胍试剂诱变得到耐氨根霉菌株MK-96-1196，使其产L-乳酸比原始菌株增加一倍，且能够使用氨水调节pH值，代替CaCO₃作为中和剂，减少了对环境的污染。华东理工大学的张嗣良、徐国谦^[40]等分别利用CaCO₃、6mol/LNaOH溶液、6mol/L氨水调控乳酸发酵过程的pH，得到的乳酸浓度为169.1g/L、187.9 g/L和170.1g/L（以发酵液的初始体积计算）。

相对于氨水和NaOH来说，CaCO₃粉末是一种缓慢型的酸中和剂，pH调节能力有限，只能将pH维持在4.9~5.2。但CaCO₃可以将乳酸以生成乳酸钙的形式沉淀下来，给下游乳酸的分离提取带来一定的方便。因此对于传统的分批式发酵，CaCO₃仍不失为一种较好的选择。氨水和NaOH溶液都可以很好地将发酵液的pH调控在6.0，其中氨水是一种最理想的酸中和剂，既有利于L-乳酸的生物合成又能促进菌体的生长。各种中和剂各具利弊，难以断定何种中和剂占绝对优势，目前针对不同类型酸中和剂对菌体生长和产酸影响的研究较少，且大部分的研究只是通过流加不同的酸中和剂，研究其对L-乳酸产量的影响，从代谢网络内部研究不同中和剂对主要节点的代谢流量分布的影响还未见报道。

1.5 代谢工程

代谢工程是对细胞内代谢途径进行定向的、有目的地改造以便更好地理解 and 利用胞内代谢进行化学转化（chemical transformation）、能量转导（energy transduction）和超分子组装（supramolecular assembly）^[53]。代谢工程是生化工程的一个前沿研究领域，自从Bailey1991年在Science上发表著名文章“Toward a Science of Metabolic Engineering”以来，其发展迅猛，并形成研究热潮^[54]。

代谢工程的广泛应用在很大程度上依赖于分子生物学技术的掌握，以及认识基因表达的调控机理，动力学特性，温度的敏感性，辅酶的相互作用、结构和功能的关系等；而了解微生物的生理代谢规律，掌握特定化合物在生物体内的合成或分解的代谢途径及主要影响因素等则是代谢工程实现的基本条件，胞内代谢分析应尽量接近胞内的真实情况，有关代谢分析的研究方法主要有：（1）

详细生理学研究、(2) 代谢通量分析 (MFA)、(3) 代谢控制分析 (MCA)、(4) 生化系统理论、(5) 动力学模型、(6) 途径热力学分析等^[55-57]。

微生物代谢工程的一般流程是：通过代谢分析，进行合理设计，然后实现代谢改造。代谢设计主要分为两类：(1) 改变代谢流，主要用于改变分支代谢途径的流向、阻断有害或无益代谢产物的合成；(2) 扩展和构建代谢途径，引入外源基因可延伸原来的代谢途径，产生新的末端代谢产物，或利用新的底物作为生物合成的原料，下面将重点介绍本文用到的代谢通量分析法及其模型^[58-59]。

代谢通量分析 (Metabolic Flux Analysis, MFA) 是代谢工程研究的重要方法之一，它依据胞内反应的化学计量学关系建立代谢流平衡模型，进而计算和分析代谢网络中所涉及的代谢流通量，由胞内代谢物质的生化反应方程式所构建的代谢流平衡数学模型克服了传统模型参数意义不明确的缺点，其适用性更强^[60-61]。该方法的基础是准稳态假设：假设细胞内的中间代谢物均处于准稳态，即其浓度变化速率为0，这样由n个中间代谢物即可得到n个关于速率的约束条件(由计量关系确定)，若选定的速率的总数目为J，则待解问题的自由度为 $F=J-n$ 。这样，通过实验测出F个不相关速率可确定整体通量分布。要得到正确的通量分布，必须对细胞内代谢路径有清楚的了解，尤其是各个分支点。缺少某一重要的分支，或增加某一根本不存在的分支，都可能使求得通量分布有很大变化。

下式即为计算代谢物质量平衡的化学计量方程：

$$Ar(t)+b(t)+Rmb=0$$

式中：A为系数矩阵， $r(t)$ 为反应速率向量， $b(t)$ 为代谢物积累速率，Rmb为残差向量。其中 $b(t)$ 为胞外代谢物积累速率和胞内代谢物积累速率，前者可通过测量获得，后者根据准稳态假设为零。这样，利用胞内反应的计量系数信息，只需测量几个胞外速率或其它约束条件(如底物代谢在分支点上的分配比例等)，就可以计算出胞内各代谢反应的速率，从而对其生理行为进行定量的描述。要利用MFA得到正确的通量分布，必须对细胞内代谢路径有清楚的了解，尤其是各个分支点^[53,56]。

目前代谢通量分析已被成功应用于以下方面：(1) 计算胞外产物的代谢通量；(2) 计算理论最大收率；(3) 辨识其他存在的代谢途径；(4) 评价代谢通量分布中可替代途径的影响；(5) 识别胞内代谢途径中可能的刚性节点或分支点。这些应用不但为构建高表达基因工程菌株奠定了理论基础，还为发酵过程控制和优化提供了理论指导^[62]。

赵学明^[63]等人首次采用代谢通量分析法对黄原胶发酵过程的实验数据进行了定量分析，根据黄单胞菌的胶合成及糖分解代谢机理求得了产胶期的内部代谢通量分布，得出了得率与呼吸商间的关系式；并根据一定维持机理求得了维持系数、P/O及理论得率等。

全志明^[64]等人通过物料衡算和线性规划方法建立了进行了代谢流分析的数学模型，并首次应用于批式培养过程，分析过程表明，细胞对葡萄糖等底物的代谢效率很低，细胞对谷氨酰胺等氨基酸浓度的变化响应迟缓，在底物充裕的迟滞期及谷氨酰胺限制性条件下的代谢效率高于对数生长期，限制谷氨酰胺等氨基酸进入能量代谢，既可减少氨的积累，也会减少乳酸的生成。

Jorgensen^[65]等在青霉素补料分批发酵实验中测定了葡萄糖、乳糖、 γ -氨基丁酸和21种氨基酸的摄取速率，青霉素V、LLD-ACV、OPC、IPN、6-APA、8-HPA等代谢产物的生成速率，以及生物量成分RNA、DNA、蛋白质、脂肪、糖类、和各种氨基酸的合成速率。在此基础上，他们建立了由61条代谢流和49种胞内代谢产物组成的化学计量模型，确定了产黄青霉生长与青霉素生产阶段的代谢流分布。

虽然代谢通量分析法在微生物培养中应用已经比较广泛，但是目前关于米根霉发酵生产L-乳酸代谢通量模型的研究还比较少。在国内，白冬梅^[20]等对米根霉发酵过程的不同阶段进行了代谢通量分析，分析了菌种选育过程中突变株细胞内部通量分布的变化，探索了最有利于提高L-乳酸生产水平的诱变方式，探讨了L-乳酸产量提高的机制，同时应用代谢通量分析法研究了不同菌体形态对产L-乳酸的影响，并分析了米根霉发酵产酸的各个阶段通量分布的状况和各种操作参数如流加培养和供氧等对其代谢通量分布产生的影响，并求出米根霉发酵中乳酸的最大理论得率 $Y_{P/S}$ 。发现进入TCA循环和乳酸合成途径的代谢通量在发酵不同阶段发生着明显的变化。

Barbara E.Wright^[66]等应用 C_{14} 放射性同位素标记的方法建立了米根霉产L-乳酸的代谢网络图。从代谢流程中可以看出，米根霉将葡萄糖从胞外转入胞内后，首先经过葡萄糖酵解（EMP）途径，转化为葡萄糖-6-磷酸（G-6-p），进而转化为1,6-二磷酸果糖（F-1,6-2p），继而转化为磷酸烯醇式丙酮酸（PEP），然后转化成丙酮酸盐（pyruvate）。至此，丙酮酸可走4条路线：其一，就是生成acetylCoA乙酰辅酶A，进入三羧酸（TCA）循环，在这个循环里会生成延胡索酸盐（fumarate）、苹果酸盐（malate）、草酰乙酸盐（oxaloacetate）；其二，就是转化为乙醛（acetaldehyde），而后生成乙醇；其三，就是丙酮酸在（LDH）乳酸脱氢酶下，生成乳酸；其四，就是生成草酰乙酸盐（xaloacetate），而后转化为苹果酸盐（malate）和延胡索酸盐（fumarate）。

Barbara E.Wright^[67]等以提高乳酸产量为目的对米根霉的葡萄糖代谢进行了代谢通量分析研究，发现当碳酸盐的浓度为10mmol/L时，丙酮酸的浓度越高，则乳酸的生成量越高，但是当碳酸盐的浓度增加后，苹果酸和富马酸的生产量也显著的增加；通过野生出发菌株和高产突变菌株的代谢通量比较，发现乳酸生成量显著增加时，进入TCA循环或乙醇合成代谢途径的通量必然减小。对米根霉乳酸发酵过程的不同阶段进行代谢通量分析，发现进入TCA循环和乳酸合

成途径的代谢通量在发酵不同阶段发生的明显变化。因此，为了更好的控制米根霉的体系和有效的应用代谢工程方法对其改造，应该在米根霉的遗传背景和代谢机理等方面深入研究，并且充分利用这方面的最新成果。

1.6 本论文研究目的、意义及主要内容

1.6.1 研究目的和意义

在传统的L-乳酸发酵工艺中， CaCO_3 是使用最为普遍的酸中和剂。但使用 CaCO_3 作为中和剂时，发酵罐中大量的 CaCO_3 容易使取料口堵塞；在菌体生长过程中，容易产生米根霉菌体包埋现象；在发酵中后期，高浓度的乳酸钙使发酵液变得粘稠，生成大量泡沫，造成跑料，易染菌；或发生固化现象，使发酵难以继续。另外，使用 CaCO_3 作为中和剂时，发酵液的主要成分是粗乳酸钙，在L-乳酸的下游分离提取过程中，产生的大量硫酸钙不仅在过滤中会造成膜堵塞，造成乳酸损失，而且产生的大量硫酸钙废渣会造成严重的环保压力和废渣处理成本，不利于L-乳酸大规模生产的可持续发展。因此，寻求新型中和剂代替传统的 CaCO_3 中和剂具有十分重要的现实意义。本文通过比较 NaOH 溶液、氨水和 CaCO_3 三种中和剂，以L-乳酸产量作为指标，通过培养基条件和工艺条件的优化、结合半连续发酵工业和代谢通量分析进行研究，选出最佳中和剂。

1.6.2 主要研究内容

(1) 不同中和剂培养基条件的优化。优化以 CaCO_3 、 NaOH 溶液和氨水作为中和剂的最佳培养基成分，通过单因素和正交试验分析氮源、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 等对L-乳酸产量的影响，优化出最佳培养基成分。

(2) 不同中和剂发酵罐工艺研究。考察了使用 CaCO_3 、 NaOH 溶液和氨水作为中和剂时的最佳浓度(用量)，并初步探讨了最佳中和剂浓度条件下的菌体形态及发酵动力学。

(3) 使用氨水、 NaOH 溶液作为中和剂时的半连续发酵。采用氨水和 NaOH 作为中和剂，在7L发酵罐上进行半连续发酵，实现使用液体中和剂的半连续发酵。

(4) 米根霉发酵生产L-乳酸的代谢通量分析。建立米根霉产L-乳酸的代谢通量模型，对使用 CaCO_3 、 NaOH 溶液、氨水作为中和剂进行代谢通量分析，以便为进一步选育高产菌种和寻求新型中和剂提供指导。

第二章 不同中和剂条件下发酵产L-乳酸的培养基条件优化

微生物在人工培养和自然条件下的生理学特性有很大的不同，合成多种产物的能力所受到的影响和调节因素也有相当大的差异^[68]。其中培养基的组成对微生物各种代谢活动的影响最为显著。因此微生物发酵的生产水平不仅取决于生产菌种本身的性能，还要赋以合适的环境条件才能使它的生产能力充分体现出来^[69]。

培养基是人们提供微生物生长繁殖和生物合成各种代谢产物所需要的按一定比例配制的多种营养物质的混合物。培养基组成对菌体生长繁殖、产物的生物合成、产品的分离精制乃至产品的质量和产量都有重要影响。只有选用适宜的培养基成分和配方，才能充分发挥微生物合成代谢产物的能力，获得最好的生产效果。一种好的培养基组成是经过较长时间的研究并经过一定时间的生产实践之后确认的，但它又随着生产菌种遗传特性的改变、发酵工艺条件的改进以及发酵罐结构的不同而不断的改进和完善^[70]。

培养基组成包括碳源、氮源、无机盐和微量元素、水、生长因子和前体等。本章对不同中和剂条件下的培养基组成进行较为详细的研究，考察的中和剂有： CaCO_3 、 NaOH 溶液、氨水；考察的培养基组成成分有：葡萄糖碳源浓度、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 氮源浓度、无机盐（镁盐、锌盐、钠盐、钾盐）的量等。

2.1 材料与方法

2.1.1 菌种

米根霉As3.819(合肥工业大学生物与食品工程学院发酵实验室保藏菌种)，保存在PDA培养基上，每2个月转接一次。

2.1.2 试剂

试剂名称	规格	厂家
氨水	分析纯	上海中试化工总公司
氢氧化钠	分析纯	上海新华化工厂
碳酸钙	分析纯	广东省精细化学品工程技术研究开发中心
硫酸铵	分析纯	广东汕头市西陇华工厂
磷酸二氢钾	分析纯	广东汕头市西陇华工厂
七水合硫酸镁	分析纯	天津博迪化工有限公司
七水合硫酸锌	分析纯	天津博迪化工有限公司
葡萄糖	分析纯	上海新华化工厂
磷酸二氢钠	分析纯	广东汕头市西陇华工厂
硫酸	分析纯	天津博迪化工有限公司
琼脂	分析纯	广州化学试剂厂
亚硫酸钠	分析纯	广州化学试剂厂
EDTA	分析纯	上海试剂一厂
酒石酸钾钠	分析纯	天津博迪化工有限公司

2.1.3 主要设备

仪器设备名称	生产单位
SWO-CJ-CO 型超净台	苏净集团安泰公司
HZQ-F160 型振荡培养箱	哈尔滨市东联电子技术开发有限公司
YXQ-SQ46-280 全自动不锈钢双层立式灭菌锅	上海三申医疗器械有限公司
BCD-232 型冰箱	荣事达集团
冰柜	白雪集团
台式高速冷冻离心机	美国 Beckman 公司
AR1140 型电子天平	Chaus Corp.Pine Brook.NJ,USA
515 高效液相色谱仪	Waters 公司
Photodiode Array Detector	Waters 公司

2.1.4 培养基

固体种子培养基：PDA(马铃薯葡萄糖)培养基，马铃薯 200g，葡萄糖 20g，琼脂 20g，蒸馏水 1000mL。具体方法：马铃薯去皮，切成块煮沸 30min，然后用 2 层纱布过滤，再加葡萄糖及琼脂，熔化后补足水至 1000mL，121℃灭菌 15 min，冷却制成固体斜面。

2.1.5 培养方法

摇瓶发酵培养：按 250mL 三角瓶 20%装液量，121℃灭菌 15min，10%的接种量，转速 (200±5) r/min，(32±0.5) °C 摇床培养 72h。

2.1.6 检测方法

发酵液中 L-乳酸含量的测定：HPLC 法^[71]。

(a) 色谱条件

用Waters515高压液相色谱仪进行测定，色谱柱为美国Merck公司的PurospHer® STAR C₁₈反相柱，250×4.6，(5μL)，流动相采用0.005 mol/L的H₂SO₄溶液，流速0.8mL/min，检测波长210nm，进样量20μL，柱温为室温，信噪比设为3。流动相使用前通过了0.45μL孔径的合成纤维素酯膜进行真空过滤，并超声波脱气。发酵液的处理是取过滤后的发酵液4mL，加入4 mL的0.5mol/L的H₂SO₄，离心分离（4000r/min，10min）除去CaSO₄，取上清液1mL，定容到100mL的容量瓶中，用0.45μL孔径的滤膜抽滤，即为待测样液。然后在上述色谱条件下每次进样20μL，将样品色谱图与有机酸标准色谱图进行对照，根据保留时间确定样品中对应的有机酸，同时还通过在样品中加入一定量的有机酸标准液，进一步确定。

(b) 标准曲线绘制

准确称取标准样乳酸0.1578g，用重蒸水定容到100mL容量瓶中，然后分别从中吸取1.0、3.0、5.0、7.0、9.0mL，加入到100mL容量瓶中，定容即为进样试液。分析时每次进样20μL，每个浓度进样5次，取其平均值。在0.016~0.14g/L范围内，以峰面积为X，样液浓度为Y，建立的乳酸工作曲线的外标方程为：

$$Y=1E-06X + 0.0099 \text{ 其相关系数 } R^2=0.9998。$$

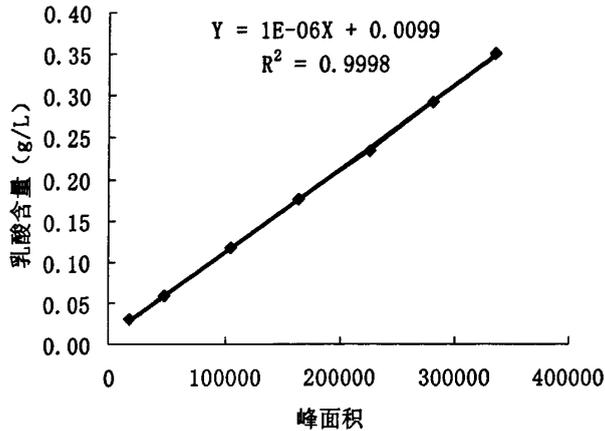


图 2-1 L-乳酸含量标准曲线

Fig.2-1 Standard curve of L-lactic acid content

2.2 实验方案

2.2.1 以CaCO₃作为中和剂的培养基优化

2.2.1.1 葡萄糖浓度对 L-乳酸产量的影响

以葡萄糖作为碳源，分别取浓度80g/L、100g/L、120g/L、140g/L、160g/L、180g/L进行单因素试验，每个浓度做三组平行实验；装液量为50mL/250mL三角

瓶；接种1mL孢子悬液（ 5×10^6 个/mL）；置于（ 32 ± 0.5 ）℃、（ 200 ± 5 ）r/min的恒温气浴摇床振荡培养72h，测定发酵液中L-乳酸产量。

2.2.1.2 (NH₄)₂SO₄浓度对L-乳酸产量的影响

以2.2.1.1试验所得最佳葡萄糖浓度为基础，取(NH₄)₂SO₄的不同浓度1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L、4.0g/L、5.0g/L、6.0g/L进行单因素试验，每个浓度做三组平行实验，其它同上，检测发酵液中L-乳酸含量。

2.2.1.3 无机盐浓度对L-乳酸产量的影响

以2.2.1.1和2.2.1.2试验所得最佳葡萄糖和(NH₄)₂SO₄浓度为基础，分别考察MgSO₄·7H₂O、ZnSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、NaH₂PO₄浓度对米根霉发酵产L-乳酸的影响，其中选取MgSO₄·7H₂O浓度：0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L、0.35g/L、0.40g/L；ZnSO₄·7H₂O浓度：0.11g/L、0.22g/L、0.33g/L、0.44g/L；KH₂PO₄浓度：0.05g/L、0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L及NaH₂PO₄浓度：0.05g/L、0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L为考察对象，发酵条件同上，每个浓度做三组平行实验，检测发酵液中L-乳酸含量。

2.2.1.4 以CaCO₃作为中和剂的正交试验

在单因素试验基础上，选择KH₂PO₄、NaH₂PO₄、ZnSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O浓度四因素为正交表考察因素，以L-乳酸产量为考察指标，选择L₁₈(3⁷)正交表进行试验，运用方差分析法分析实验结果，因素与水平如表2-1所示。其中培养基其余成分以前面确定最优水平为基础。

表 2-1 正交试验因素水平表

Table 2-1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A	B	C	D
	MgSO ₄ ·7H ₂ O(g/L)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O(g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	NaH ₂ PO ₄ (g/L)
1	0.20	0.11	0.05	0.10
2	0.30	0.22	0.15	0.20
3	0.40	0.33	0.25	0.30

2.2.2 以NaOH溶液作为中和剂的培养基优化

2.2.2.1 Ca²⁺浓度对L-乳酸产量的影响

取浓度分别为0g/L、1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L、4.0g/L、5.0g/L、6.0g/L、7.0g/L的CaCO₃和浓度分别为0g/L、0.5g/L、1.0g/L、1.5g/L、2.0g/L、2.5g/L、3.0g/L的CaCl₂进行摇瓶单因素试验，其余成分以发酵培养基为基础，每个浓度做三组平行实验；装液量为50mL/250mL三角瓶；接种1mL孢子悬液（ 5×10^6 个/mL）；置于（ 32 ± 0.5 ）℃、（ 200 ± 5 ）r/min的恒温气浴摇床振荡培养72h，每隔4~6h滴加NaOH溶液控制pH在5.0~5.5范围内，测定发酵液中L-乳酸产量。

2.2.2.2 (NH₄)₂SO₄浓度对L-乳酸产量的影响

以2.2.2.1试验所得最佳钙离子浓度为基础，取(NH₄)₂SO₄的不同浓度1.0g/L、

2.0g/L、3.0g/L、4.0g/L、5.0g/L、6.0g/L进行单因素试验，每个浓度做三组平行实验，其它同上，检测发酵液中L-乳酸含量。

2.2.2.3 无机盐不同浓度对L-乳酸产量的影响

以2.2.2.1和2.2.2.2试验所得最佳Ca²⁺和(NH₄)₂SO₄浓度为基础，分别考察MgSO₄·7H₂O浓度：0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L、0.35g/L、0.40g/L、0.45g/L；ZnSO₄·7H₂O浓度：0g/L、0.11g/L、0.22g/L、0.33g/L、0.44g/L、0.55g/L；KH₂PO₄浓度：0.05g/L、0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L及NaH₂PO₄浓度：0g/L、0.05g/L、0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L对L-乳酸发酵效果的影响，发酵条件同上，每个浓度做三组平行实验，检测发酵液中L-乳酸含量。

2.2.2.4 以NaOH溶液作为中和剂的正交试验

在单因素试验基础上，选择ZnSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O、NaH₂PO₄、KH₂PO₄浓度四因素为正交表考察因素，以L-乳酸产量为考察指标，选择L₁₆(4⁵)正交表进行试验，运用方差分析法分析实验结果，结果如表2-2所示。其中培养基其余成分以前面确定最优水平为基础。

表 2-2 正交试验因素水平表

Table 2-2 Factors and levels of orthogonal test

水平	A ZnSO ₄ ·7H ₂ O(g/L)	B MgSO ₄ ·7H ₂ O(g/L)	C NaH ₂ PO ₄ (g/L)	D KH ₂ PO ₄ (g/L)
1	0.11	0.10	0.10	0.05
2	0.22	0.20	0.15	0.15
3	0.33	0.30	0.20	0.25
4	0.44	0.40	0.25	0.35

2.2.3 以氨水作为中和剂的培养基优化

2.2.3.1 Ca²⁺浓度对 L-乳酸产量的影响

选取 CaCO₃ 浓度 0g/L、1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L、4.0g/L、5.0g/L、6.0g/L、7.0g/L 和 CaCl₂ 浓度 0g/L、0.5g/L、1.0g/L、1.5g/L、2.0g/L、2.5g/L、3.0g/L 进行摇瓶单因素试验，其余条件同 2.2.2，每隔 4~6h 滴加氨水溶液控制 pH 在 5.0~5.5 范围内，测定发酵液中 L-乳酸产量。

2.2.3.2 (NH₄)₂SO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

以 2.2.3.1 试验所得最佳 Ca²⁺浓度为基础，取(NH₄)₂SO₄ 不同浓度 1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L、4.0g/L、5.0g/L、6.0g/L 进行单因素试验，每个浓度做三组平行实验，其它同上，检测发酵液中 L-乳酸含量。

2.2.3.3 无机盐同浓度对 L-乳酸产量的影响

以 2.2.3.1 和 2.2.3.2 试验所得最佳 Ca²⁺和(NH₄)₂SO₄ 浓度为基础，分别选取 MgSO₄·7H₂O 浓度 0.05g/L、0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L、0.35g/L、0.40g/L、0.45g/L；ZnSO₄·7H₂O 浓度 0.11g/L、0.22g/L、0.33g/L、0.44g/L、0.55g/L；KH₂PO₄ 浓度 0.05g/L、0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L

及 NaH₂PO₄ 浓度 0.05g/L、0.10g/L、0.15g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L 进行摇瓶试验，发酵条件同上，每个浓度做三组平行实验，检测发酵液中 L-乳酸含量。

2.2.3.4 以氨水作为中和剂的正交试验

在单因素试验基础上，选择(NH₄)₂SO₄、NaH₂PO₄、KH₂PO₄浓度三因素为正交表考察因素，以L-乳酸产量为考察指标，选择L₉(3⁴)正交表进行试验，运用方差分析法分析实验结果，结果如图2-3所示。其中培养基其余成分以前面确定最优水平为基础。

表 2-3 正交试验因素水平表

Table 2-3 Factors and levels of orthogonal test

水平	A	B	C
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	NaH ₂ PO ₄ (g/L)
1	1.0	0.05	0.05
2	3.0	0.15	0.15
3	5.0	0.25	0.25

2.3 结果与讨论

2.3.1 以CaCO₃作为中和剂

2.3.1.1 葡萄糖浓度对L-乳酸产量的影响

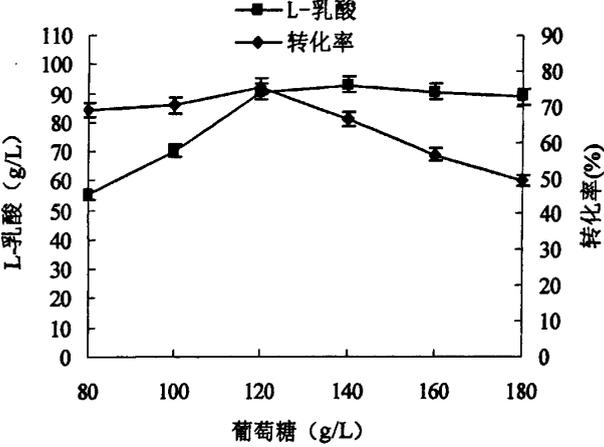


图 2-2 葡萄糖浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-2 Effect of the glucose concentration on the L-lactic acid production

由图2-2可知：葡萄糖浓度小于120g/L时，L-乳酸产量随葡萄糖浓度的增加而迅速提高，因为在碳源供给不足的情况下，菌体生长受到抑制以至于L-乳酸产量合成过少；当葡萄糖浓度为120g/L时，L-乳酸对葡萄糖的转化率达到最大；当葡萄糖浓度大于120g/L时，L-乳酸产量仍在增加，但L-乳酸对葡萄糖的转化

率却逐渐下降，超过160g/L时，L-乳酸产量及对葡萄糖的转化率都在下降，由于供给的碳源浓度过高，营养过于丰富，引起菌体异常繁殖，对菌体的代谢、产物的合成及氧的传递都会产生不良影响，致使产物浓度降低，即所谓的底物抑制；因此，要控制好碳源浓度才能使菌体生长迅速、产物合成高效。综合分析得L-乳酸的最佳浓度为120g/L，此时L-乳酸产量为90.60g/L，转化率为75.50%。

2.3.1.2 (NH₄)₂SO₄浓度对L-乳酸产量的影响

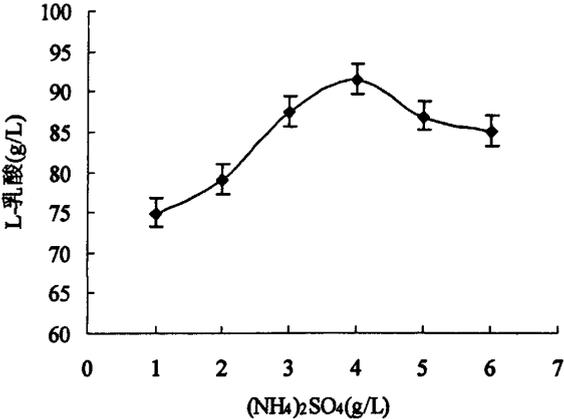


图 2-3 (NH₄)₂SO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-3 Effect of the (NH₄)₂SO₄ concentration on the L-lactic acid production

氮源主要用于构成菌体细胞物质（如氨基酸、蛋白质、核酸等）和含氮代谢物。由图2-3可知，随着(NH₄)₂SO₄浓度的增加，L-乳酸产量先上升后下降，当(NH₄)₂SO₄浓度为4.0g/L时L-乳酸的产量最高。(NH₄)₂SO₄浓度低于4.0g/L时，氮源不足导致菌体生长不旺盛，从而导致L-乳酸产量不高；(NH₄)₂SO₄浓度高于4.0g/L时，氮源过剩使菌体密度过高，导致L-乳酸产量下降。因此，最佳(NH₄)₂SO₄浓度为4.0g/L。

2.3.1.3 MgSO₄·7H₂O浓度对L-乳酸产量的影响

镁是某些酶的辅酶或激活剂，除能激活一些酶活性外，还能提高菌体对自身产物的耐受性。由图2-4可知，当MgSO₄·7H₂O浓度小于0.25g/L时，L-乳酸产量变化不明显；随着MgSO₄·7H₂O浓度从0.25g/L增加到0.35g/L，L-乳酸产量明显增加；当MgSO₄·7H₂O浓度超过0.35g/L时，L-乳酸产量开始下降。综合考虑各方面因素，选取0.35g/L作为以CaCO₃作为中和剂的最佳MgSO₄·7H₂O浓度。

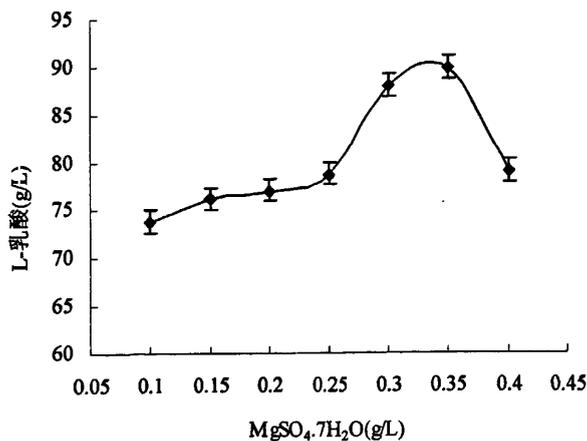


图 2-4 MgSO₄·7H₂O 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-4 Effect of the MgSO₄·7H₂O concentration on the L-lactic acid production

2.3.1.4 ZnSO₄·7H₂O浓度对L-乳酸产量的影响

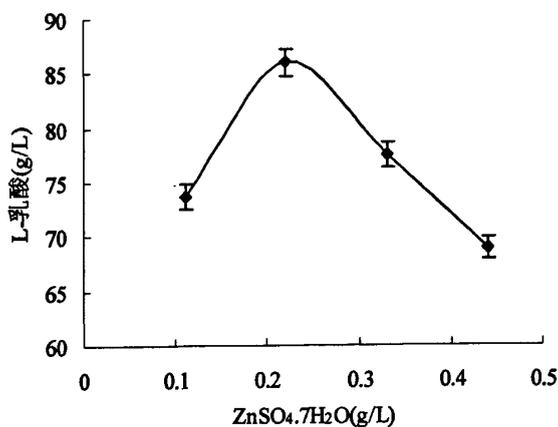


图 2-5 ZnSO₄·7H₂O 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-5 Effect of the ZnSO₄·7H₂O concentration on the L-lactic acid production

锌离子是米根霉菌体生长和产酸过程中不可或缺的离子，由图2-5可知，ZnSO₄·7H₂O浓度为0.22g/L时，L-乳酸产量最高，低于或高于0.22g/L时，对菌体生长和L-乳酸产量都有较大影响。

2.3.1.5 KH₂PO₄对L-乳酸产量的影响

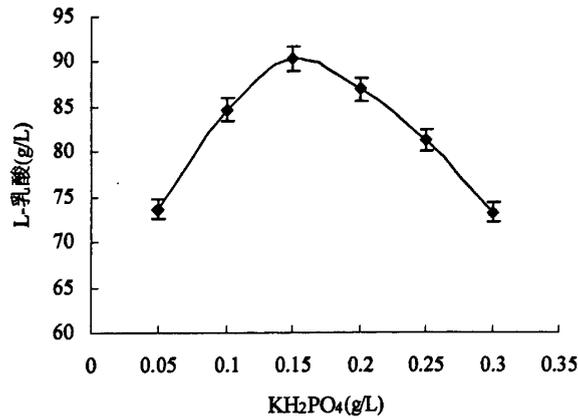


图 2-6 KH₂PO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-6 Effect of the KH₂PO₄ concentration on the L-lactic acid production

钾与某些酶偶联，能调节细胞的渗透压，从而维持细胞的正常代谢。由图 2-6可知，当KH₂PO₄为0.15g/L时，L-乳酸产量最高。K⁺浓度对米根霉菌体的生长有很大影响，当发酵液中不含K⁺时，米根霉菌株几乎不生长，只有达到一定量时，菌体生长正常。考虑到多因素的共同影响，选择0.15g/L作为该因素的中间水平值，通过正交试验后决定其最佳浓度。

2.3.1.6 NaH₂PO₄对L-乳酸产量的影响

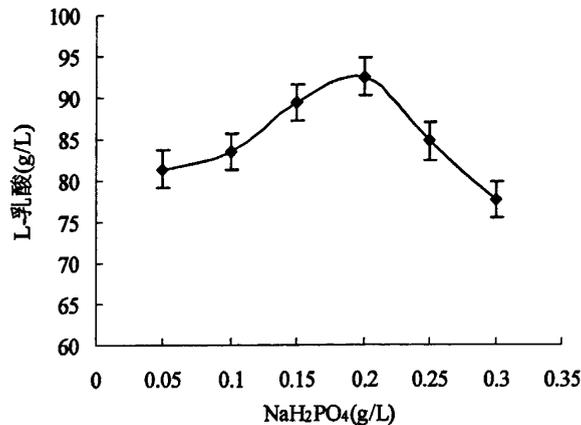


图 2-7 NaH₂PO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-7 Effect of the NaH₂PO₄ concentration on the L-lactic acid production

由图2-7可知，当NaH₂PO₄为0.20g/L时，L-乳酸产量最高。考虑到多因素的共同影响，选择0.20 g/L作为该因素的中间水平值，通过正交试验后决定其最佳浓度。

2.3.1.7 以 CaCO₃ 作为中和剂的正交试验结果

表 2-4 $L_{18}(3^7)$ 正交实验方案及实验结果分析

Table 2-4 Design and result of orthogonal test $L_{18}(3^7)$

因素								
	空列	A	B	空列	C	D	空列	L-乳酸 (g/L)
1	1	1 (0.25)	1 (0.11)	1	1(0.05)	1(0.1)	1	74.30±0.38
2	1	2 (0.35)	2 (0.22)	2	2(0.15)	2(0.2)	2	94.50±0.25
3	1	3 (0.45)	3 (0.33)	3	3(0.25)	3(0.3)	3	79.05±0.46
4	2	1	2	2	2	3	3	88.15±0.31
5	2	2	3	3	3	1	1	89.95±0.43
6	2	3	1	1	1	2	2	83.59±0.27
7	3	1	1	1	3	2	3	87.25±0.29
8	3	2	2	2	1	3	1	85.65±0.18
9	3	3	3	3	2	1	2	84.85±0.30
10	1	1	3	3	2	2	1	87.28±0.41
11	1	2	1	1	3	3	2	91.54±0.51
12	1	3	2	2	1	1	3	85.89±0.36
13	2	1	3	3	1	3	2	84.65±0.24
14	2	2	1	1	2	1	3	90.90±0.37
15	2	3	2	2	3	2	1	80.60±0.34
16	3	1	2	2	3	1	2	80.90±0.21
17	3	2	3	3	1	2	3	90.25±0.22
18	3	3	1	1	2	3	1	88.52±0.35
k_1	85.43	83.76	84.95	86.02	84.06	84.47	84.38	
k_2	86.31	90.47	88.46	85.95	89.03	87.25	86.67	
k_3	86.24	83.75	84.56	86.01	84.88	86.26	86.92	
R	0.88	6.72	3.90	0.07	4.97	2.78	2.54	

表 2-5 方差分析表

Table 2-5 Analysis of variance

方差来源	SS	df	MS	F	显著性	F_α
A	180.23	2	90.12	20.56	**	$F_{0.01}(2,2)=10.92$
B	55.36	2	27.68	6.32	*	$F_{0.05}(2,2)=5.14$
C	85.41	2	42.71	9.74	*	$F_{0.1}(2,2)=3.46$
D	23.84	2	11.92	2.72	[*]	
e	26.30	6	4.38			
T	371.14					

通过对正交实验结果分析可知，四种无机盐对L-乳酸产量影响的显著性顺

序为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，其中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对L-乳酸有非常显著的影响， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 KH_2PO_4 有显著影响， NaH_2PO_4 没有显著影响。由表2-4可知，在 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_2\text{D}_2$ 条件下，L-乳酸产量最高，为94.50g/L。经过重复试验验证， $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_2\text{D}_2$ 为最佳无机盐条件，即最佳无机盐浓度为： $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35g/L， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22g/L， KH_2PO_4 0.15g/L， NaH_2PO_4 0.20g/L。

2.3.2 以NaOH作为中和剂

2.3.2.1 Ca^{2+} 浓度对L-乳酸产量的影响

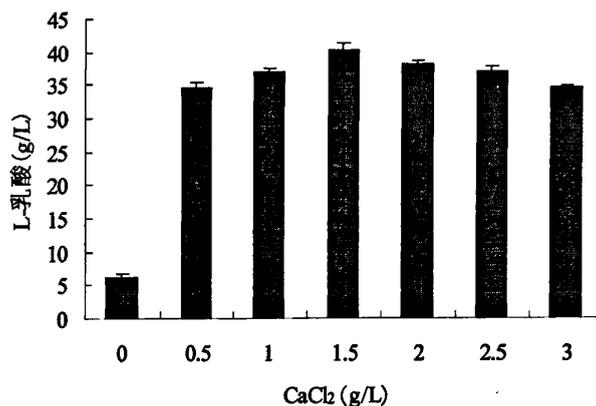


图2-8 CaCl_2 浓度对产酸量的影响

Fig.2-8 Effect of concentration of CaCl_2 on the L-lactic acid production

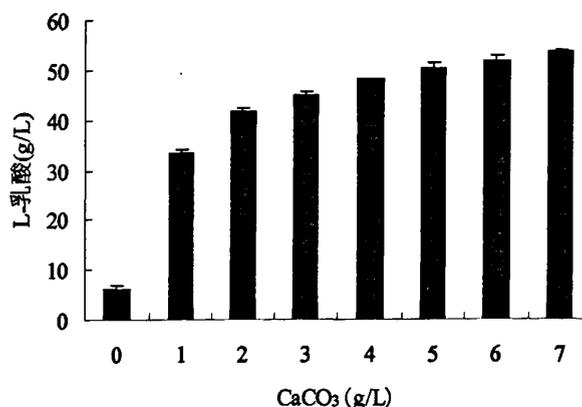


图 2-9 CaCO_3 浓度对产酸量的影响

Fig.2-9 Effect of concentration of CaCO_3 on the L-lactic acid production

Ca^{2+} 在菌丝体的生长和菌丝球的形成过程中起着非常重要的作用。结果如图2-8、2-9所示：添加 Ca^{2+} 后L-乳酸产量显著提高，添加 CaCO_3 和 CaCl_2 后L-乳酸产量分别未添加 Ca^{2+} 的8.8倍和6.6倍。

由图2-8知，随着CaCl₂浓度增加，L-乳酸产量先上升后下降，可能是高浓度的Cl⁻对菌体有毒害作用，因此不采用CaCl₂；由图2-9可知，随着CaCO₃含量增加，L-乳酸产量不断增多，参照最佳CaCl₂最佳浓度，选用2.0 g/L CaCO₃，因CaCO₃易在发酵罐中沉淀，可适当增加CaCO₃用量。

2.3.2.2 (NH₄)₂SO₄浓度对L-乳酸产量的影响

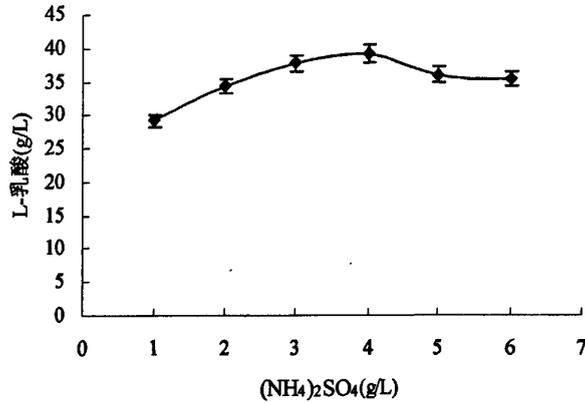


图 2-10 (NH₄)₂SO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-10 Effect of the (NH₄)₂SO₄ concentration on the L-lactic acid production

由图 2-10 可知，以 NaOH 溶液作为中和剂时，(NH₄)₂SO₄ 浓度为 4.0g/L 时，L-乳酸产量最高。

2.3.2.3 MgSO₄·7H₂O 浓度对 L-乳酸产量的影响

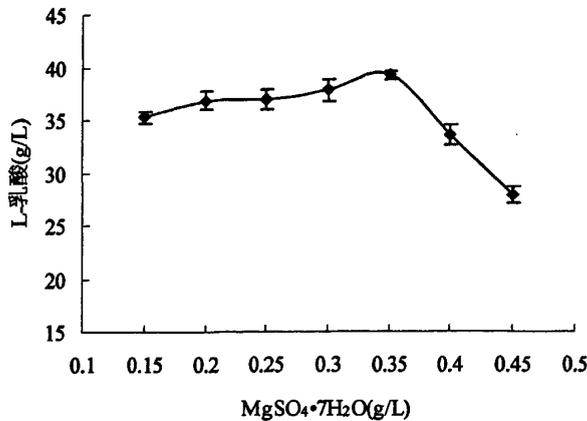


图 2-11 MgSO₄·7H₂O 对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-11 Effect of the MgSO₄·7H₂O concentration on the L-lactic acid production

由图 2-11 可以看出，以 NaOH 溶液作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂时，当 MgSO₄·7H₂O 浓度在 0.35g/L 以下时，对 L-乳酸产量影响不大，但在试验过程中发现，不添加 MgSO₄·7H₂O 时，米根霉菌体几乎不生长；当 MgSO₄·7H₂O

浓度大于 0.35g/L 时，随着 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度的增加，L-乳酸产量下降。因此，选取 0.35g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 作为该因素的中间水平值，通过正交试验后决定其最佳浓度。

2.3.2.4 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度对 L-乳酸产量的影响

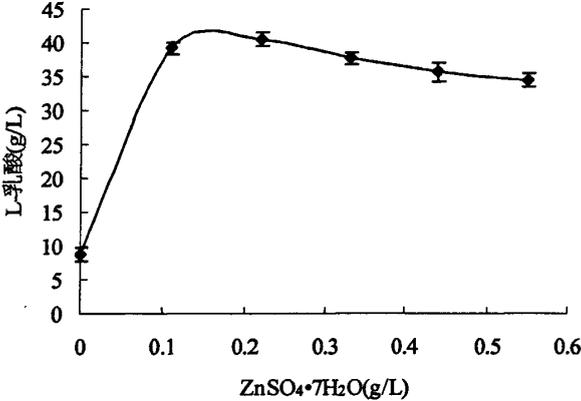


图 2-12 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-12 Effect of the $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on the L-lactic acid production

由图 2-12 可以看出， $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 添加与否对米根霉菌株生长和 L-乳酸产量有很大影响，当 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度大于 0.11g/L 时，L-乳酸产量变化不大，其中 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度为 0.22g/L 时 L-乳酸产量最高，综合考虑各种因素影响，选取 0.22g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 作为该因素的中间水平值，通过正交试验后决定其最佳浓度。

2.3.2.5 KH_2PO_4 对 L-乳酸产量的影响

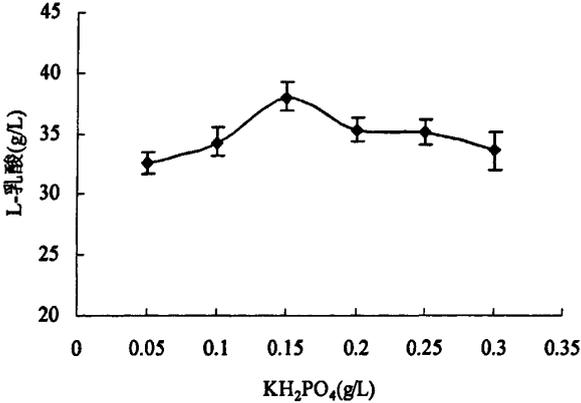


图 2-13 KH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-13 Effect of the KH_2PO_4 concentration on the L-lactic acid production

由图 2-13 可知， KH_2PO_4 浓度从 0g/L 到 0.05g/L，L-乳酸产量从 6.26g/L 增

加到 32.63g/L, 当 KH_2PO_4 浓度大于 0.05g/L 时, L-乳酸产量变化不大, KH_2PO_4 浓度为 0.15g/L 时, L-乳酸产量最高。

2.3.2.6 NaH_2PO_4 对 L-乳酸产量的影响

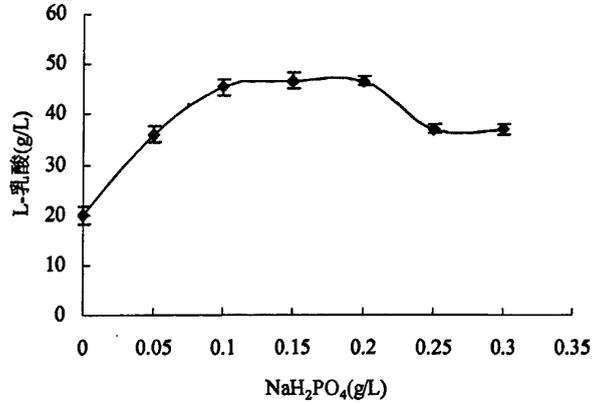


图 2-14 NaH_2PO_4 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-14 Effect of the NaH_2PO_4 concentration on the L-lactic acid production

由图 2-14 可知, 以 NaOH 溶液作为米根霉发酵产 L-乳酸的中和剂时, 随着 NaH_2PO_4 浓度的增加, L-乳酸产量先增加后下降, 当 NaH_2PO_4 浓度为 0.10g/L 到 0.20g/L 时, L-乳酸产量几乎不变化, 综合考虑各种因素, 取 0.10g/L NaH_2PO_4 作为该因素的中间水平值, 通过正交试验后决定其最佳浓度。

2.3.2.7 以 NaOH 溶液作为中和剂的正交试验

表 2-6 $L_{16}(4^5)$ 正交实验方案及实验结果分析

Table 2-6 Design and result of orthogonal test $L_{16}(4^5)$

因素						
	A	B	空列	C	D	L-乳酸 (g/L)
1	1 (0.11)	1 (0.15)	1	1 (0.10)	1 (0.05)	32.78±0.15
2	1	2 (0.25)	2	2 (0.15)	2 (0.15)	32.91±0.26
3	1	3 (0.35)	3	3 (0.20)	3 (0.25)	32.38±0.17
4	1	4 (0.45)	4	4 (0.25)	4 (0.35)	30.79±0.52
5	2 (0.22)	1	2	3	4	32.02±0.36
6	2	2	1	4	3	32.60±0.24
7	2	3	4	1	2	36.62±0.42
8	2	4	3	2	1	34.42±0.25
9	3 (0.33)	1	3	4	2	32.34±0.35
10	3	2	4	3	1	32.57±0.22
11	3	3	1	2	4	33.37±0.39
12	3	4	2	1	3	34.12±0.11
13	4 (0.44)	1	4	2	3	32.21±0.37

14	4	2	3	1	4	32.68±0.24
15	4	3	2	4	1	33.27±0.27
16	4	4	1	3	2	32.53±0.38
k ₁	32.215	32.338	32.820	34.050	33.260	
k ₂	33.915	32.690	33.080	33.227	33.600	
k ₃	33.100	33.910	32.955	32.375	32.828	
k ₄	32.672	32.965	33.047	32.252	32.215	
R	1.700	1.572	0.260	1.800	1.385	

表 2-7 方差分析表

Table 2-7 Analysis of variance

方差来源	SS	df	MS	F	显著性	F _α
A	6.27	3	2.09	39.43	**	F _{0.01(3,3)} =29.46
B	5.45	3	1.82	34.34	**	F _{0.05(3,3)} =9.28
C	8.42	3	2.81	53.02	**	F _{0.1(3,3)} =5.39
D	4.29	3	1.43	26.98	*	
e	0.16	3	0.053			
T	24.59					

通过正交实验结果可知，四种无机盐对 L-乳酸产量影响的显著性顺序为 NaH₂PO₄>ZnSO₄·7H₂O>MgSO₄·7H₂O>KH₂PO₄，其中 MgSO₄·7H₂O、ZnSO₄·7H₂O 和 NaH₂PO₄ 有非常显著影响，KH₂PO₄ 有显著影响。由表 2-6 可知，在 A₂B₃C₁D₂ 条件下，L-乳酸产量最高 36.62g/L。经过重复试验验证，利用 NaOH 作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂时，最佳无机盐组成成分为：NaH₂PO₄0.10g/L，ZnSO₄·7H₂O0.22g/L，MgSO₄·7H₂O0.35g/L，KH₂PO₄0.15 g/L。

2.3.3 以氨水作为中和剂

2.3.3.1 Ca²⁺对L-乳酸发酵的影响

以氨水作为中和剂，在发酵培养基中加入不同量的CaCO₃和CaCl₂进行摇瓶试验，结果如图2-14、2-15所示：添加CaCO₃和CaCl₂后L-乳酸产量分别是未添加Ca²⁺的8.5倍和5.3倍。由图2-14知，随着CaCl₂浓度增加，L-乳酸产量先上升后下降，可能是高浓度的Cl⁻对菌体有毒害作用，因此不采用CaCl₂；由图2-15可知，随着CaCO₃含量增加，L-乳酸产量不断增多，参照最佳CaCl₂最佳浓度，选用2.0 g/L CaCO₃，因CaCO₃易在发酵罐中沉淀，无法完全利用，可适当增加CaCO₃用量。

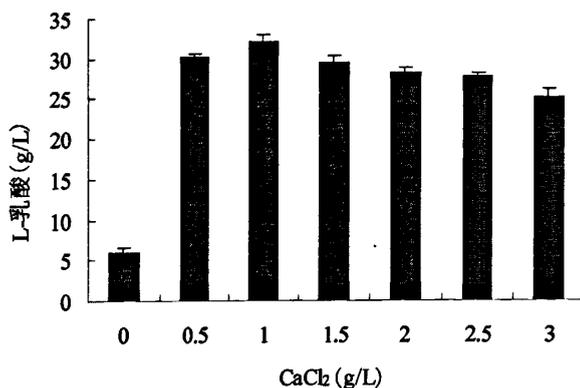


图2-15 CaCl₂浓度对产酸量的影响

Fig.2-15 Effect of concentration of CaCl₂ on the L-lactic acid production

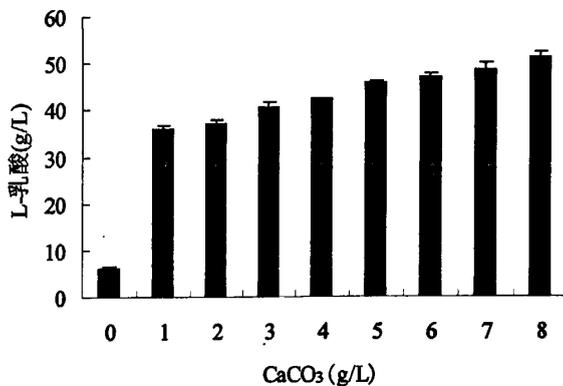


图 2-16 CaCO₃ 浓度对产酸量的影响

Fig.2-16 Effect of concentration of CaCO₃ on the L-lactic acid production

2.3.3.2 (NH₄)₂SO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

使用氨水作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂时，不断注入的氨水使得发酵液中氨浓度不断增加，可能会影响到原始氮源的浓度。由图 2-17 可知，随着 (NH₄)₂SO₄ 浓度增加，L-乳酸产量不断下降，当 (NH₄)₂SO₄ 浓度为 1.0g/L 时，L-乳酸产量达到最高值，相比 CaCO₃ 和 NaOH 作为中和剂时氮源浓度下降 3.0g/L。

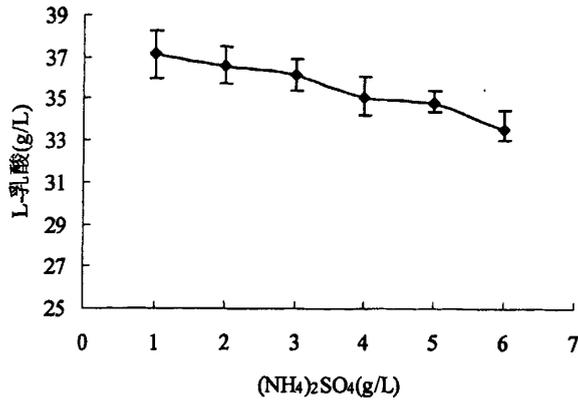


图 2-17 (NH₄)₂SO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-17 Effect of the (NH₄)₂SO₄ concentration on the L-lactic acid production

2.3.3.3 MgSO₄·7H₂O 对 L-乳酸产量的影响

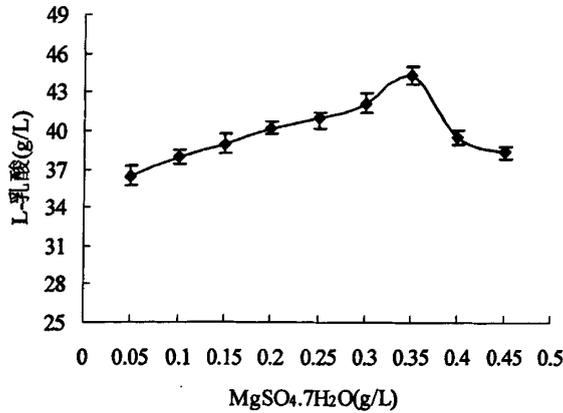


图 2-18 MgSO₄·7H₂O 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-18 Effect of the MgSO₄·7H₂O concentration on the L-lactic acid production

由图 2-18 可知，使用氨水溶液作为中和剂时，MgSO₄·7H₂O 从 0.05g/L 到 0.35 g/L，L-乳酸产量缓慢上升；当 MgSO₄·7H₂O 浓度超过 0.35g/L 时，L-乳酸产量迅速下降，因此取 0.35g/L 为 MgSO₄·7H₂O 最佳浓度。

2.3.3.4 ZnSO₄·7H₂O 对 L-乳酸产量的影响

图 2-19 表示氨水作为中和剂时 ZnSO₄·7H₂O 浓度对 L-乳酸产量的影响，取 0.22g/L ZnSO₄·7H₂O 作为该因素的水平中间值。

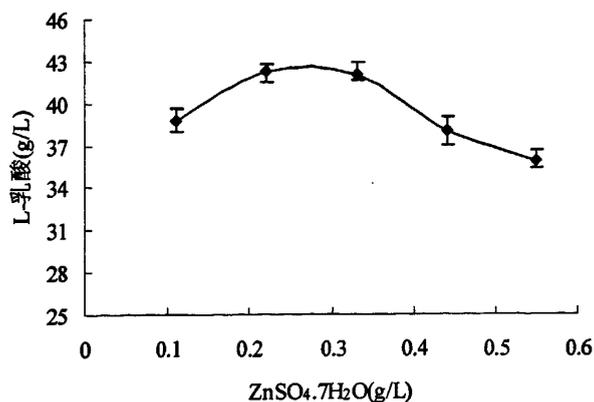


图 2-19 ZnSO₄·7H₂O 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-19 Effect of the ZnSO₄·7H₂O concentration on the L-lactic acid production

2.3.3.5 NaH₂PO₄ 对 L-乳酸产量的影响

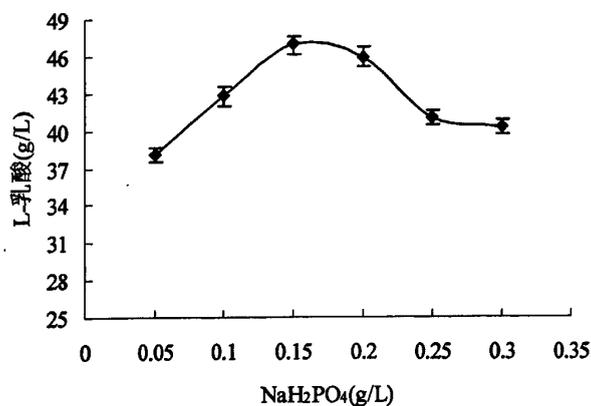


图 2-20 NaH₂PO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-20 Effect of the NaH₂PO₄ concentration on the L-lactic acid production

由图 2-20 可以看出, NaH₂PO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响相对比较平稳, 当 NaH₂PO₄ 浓度为 0.15g/L 时, L-乳酸产量达到最高值。

2.3.3.6 KH₂PO₄ 对 L-乳酸产量的影响

由图 2-21 可以看出, 利用氨水中和和发酵生成的乳酸, 并以 L-乳酸产量为指标, KH₂PO₄ 的最佳浓度为 0.15g/L。

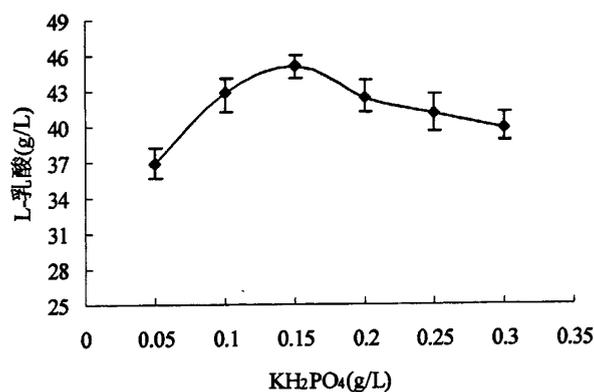


图 2-21 KH₂PO₄ 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.2-21 Effect of the KH₂PO₄ concentration on the L-lactic acid production

2.3.3.7 以氨水作为中和剂的正交试验

表 2-8 L₉ (3⁴) 正交实验方案及实验结果分析

Table 2-8 Design and result of orthogonal test L₉ (3⁴)

	因素				L-乳酸 (g/L)
	A	B	C	空列	
1	1 (1)	1(0.05)	1 (0.05)	1	44.47±0.09
2	1	2(0.15)	2 (0.15)	2	46.88±0.32
3	1	3(0.25)	3 (0.25)	3	43.51±0.33
4	2 (3)	1	2	3	40.86±0.18
5	2	2	3	1	41.57±0.40
6	2	3	1	2	40.63±0.15
7	3 (5)	1	3	2	40.56±0.25
8	3	2	1	3	41.14±0.30
9	3	3	2	1	40.80±0.27
k ₁	44.95	41.96	42.08	42.28	
k ₂	41.02	43.20	42.85	42.69	
k ₃	40.83	41.65	41.88	41.84	
R	4.12	1.55	0.96	0.85	

表 2-9 方差分析表

Table 2-9 Analysis of variance

方差来源	SS	df	MS	F	显著性	F_{α}
A	32.44	2	16.22	29.85	*	$F_{0.01}(2,2)=99.00$
B	4.03	2	2.02	3.71		$F_{0.05}(2,2)=19.00$
C	1.56	2	0.78	1.43		$F_{0.1}(2,2)=9.00$
e	1.09	2	0.55			
T	25.76					

通过对正交实验结果分析可知，以氨水作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂时， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 L-乳酸产量有显著影响， KH_2PO_4 和 NaH_2PO_4 对 L-乳酸产量影响不大。由表 2-8 可知，在 $A_1B_2C_2$ 条件下，L-乳酸产量最高 46.88g/L。经过重复试验验证，利用 NaOH 溶液作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂时，最佳无机盐组成成分为： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g/L， NaH_2PO_4 0.15g/L， KH_2PO_4 0.15 g/L。

2.4 本章小结

通过单因素试验和正交试验，以 L-乳酸产量作为指标，分别对以 CaCO_3 、NaOH 溶液和氨水溶液作为中和剂的培养基组成进行优化。

(1) 以 CaCO_3 作为中和剂时的最优发酵培养基：

葡萄糖 120 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35 g/L， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g/L， KH_2PO_4 0.15 g/L， NaH_2PO_4 0.20 g/L。

(2) 以 NaOH 溶液作为中和剂的最优发酵培养基：

葡萄糖 120 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35 g/L， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g/L， KH_2PO_4 0.15 g/L， NaH_2PO_4 0.10g/L， CaCO_3 2.0g/L。

(3) 以氨水溶液作为中和剂的最优发酵培养基：

葡萄糖 120 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35 g/L， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g/L， KH_2PO_4 0.15 g/L， NaH_2PO_4 0.15 g/L， CaCO_3 2.0g/L。

第三章 不同中和剂条件下发酵产 L-乳酸的工艺条件研究

在米根霉发酵生产L-乳酸过程中，由于不断生成的L-乳酸使发酵液pH逐渐降低，导致对米根霉菌体生长和L-乳酸形成产生抑制作用，为此不得不采取加入碱性中和剂的办法来中和生成的L-乳酸。传统上一般采用CaCO₃来中和生成的L-乳酸，以维持最优pH值。但生成的乳酸钙不仅增加了L-乳酸分离提取的困难，影响产品质量，并且造成严重的污染。因此，采用发酵新工艺，替代传统CaCO₃中和剂的研究具有十分重要的现实意义，为国内外乳酸生产商和研究者高度关注，但目前针对不同类型的酸中和剂对米根霉菌体的生长和产酸影响的研究不多。

与其它丝状真菌属的微生物一样，米根霉生长形态非常复杂，主要有菌丝（絮状）、菌球和块状聚集物。米根霉菌体的生长状态受到多种因素的影响：菌体本身特性，营养供应情况，培养基的pH值，搅拌；通气，接种量和基质浓度等。米根霉在不同pH值条件下，生长状况有所差别，L-乳酸产量也受到影响，且当采用的中和剂不同时，菌体形态也会发生变化。

本章以L-乳酸产量为指标，考察了米根霉发酵产L-乳酸的最适pH值；确定了使用NaOH溶液、氨水溶液和CaCO₃作为中和剂时的最适浓度，且在最适浓度考察的基础上进行菌体形态的影响研究和动力学研究。

3.1 材料与方法

3.1.1 菌种

米根霉As3.819(合肥工业大学生物与食品工程学院发酵实验室保藏菌种)，保存在PDA培养基上，每2个月转接一次。孢子由PDA培养基产生，用无菌蒸馏水洗下孢子制成悬液。

3.1.2 试剂

试剂名称	规格	厂家
氨水	分析纯	上海中试化工总公司
氢氧化钠	分析纯	上海新华化工厂
硫酸铵	分析纯	广东汕头市西陇华工厂
磷酸二氢钾	分析纯	广东汕头市西陇华工厂
七水合硫酸镁	分析纯	天津博迪化工有限公司
七水合硫酸锌	分析纯	天津博迪化工有限公司
葡萄糖	分析纯	上海新华化工厂
磷酸二氢钠	分析纯	广东汕头市西陇华工厂
硫酸	分析纯	天津博迪化工有限公司
DNS	分析纯	上海新华化工厂
盐酸	分析纯	宿州化学试剂有限公司
结晶酚	分析纯	上海新华化工厂
琼脂	分析纯	广州化学试剂厂
亚硫酸钠	分析纯	广州化学试剂厂
碳酸钙	分析纯	广东省精细化学品工程技术研究开发中心
酒石酸钾钠	分析纯	天津博迪化工有限公司

3.1.3 主要设备

仪器设备名称	生产单位
SWO-CJ-CO 型超净台	苏净集团安泰公司
HZQ-F160 型振荡培养箱	哈尔滨市东联电子技术开发有限公司
YXQ-SQ46-280S 全自动不锈钢双层立式灭菌锅	上海三申医疗器械有限公司
BCD-232 型冰箱	荣事达集团
冰柜	白雪集团
DHG-9240A 电热恒温干燥箱	上海浦东跃欣科学仪器厂
台式高速冷冻离心机	美国 Beckman 公司
721 分光光度计	上海第三分析仪器厂
AR1140 型电子天平	Chaus Corp.Pine Brook.NJ,USA
515 高效液相色谱仪	Waters 公司
Photodiode Array Detector	Waters 公司
7L 智能控制发酵罐系统	镇江东方生物工程设备技术公司

3.1.4 培养基

固体种子培养基：见 2.1.4。

以CaCO₃作为中和剂的发酵培养基为：葡萄糖120g/L，(NH₄)₂SO₄ 4.0g/L，KH₂PO₄ 0.15g/L，NaH₂PO₄ 0.15g/L，ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L，MgSO₄·7H₂O 0.35g/L，CaCO₃ 60g/L。

以NaOH作为中和剂的发酵培养基：

首批发酵培养基：葡萄糖120g/L，(NH₄)₂SO₄ 4.0g/L，MgSO₄·7H₂O 0.35g/L，

ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L, NaH₂PO₄ 0.10g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L。

罐发酵补料培养基: 葡萄糖80g/L, (NH₄)₂SO₄ 4.0g/L, MgSO₄·7H₂O 0.35g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L, NaH₂PO₄ 0.15g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L。

以氨水作为中和剂的发酵培养基:

首批发酵培养基: 葡萄糖120g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0g/L, MgSO₄·7H₂O 0.35g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L, NaH₂PO₄ 0.15g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L。

罐发酵补料培养基: 葡萄糖80g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0g/L, MgSO₄·7H₂O 0.35g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L, NaH₂PO₄ 0.15g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L。

3.1.5 培养方法

摇瓶发酵培养: 按 250mL 三角瓶 20%装液量, 121℃灭菌 15min, 10%的接种量, 转速 (200±5) r/min, (32±0.5) °C摇床培养 72h。

7L发酵罐发酵: 装液量5L/7L发酵罐; 通气量6L/min; 搅拌转速300r/min; pH值: 流加NaOH溶液、氨水溶液控制pH在5.5±0.2左右; (32±0.5) °C下培养72h。

7L发酵罐半连续发酵: 装液量5L/7L发酵罐; 通气量6L/min; 搅拌转速300r/min; pH值: 流加NaOH溶液、氨水溶液控制pH在5.5±0.2左右; 温度控制在 (32±0.5) °C。首批发酵72h, 后续批次发酵24h。

3.1.6 检测方法

3.1.6.1 发酵液中 L-乳酸产量测定

采用 HPLC 法, 同 2.1.6。

3.1.6.2 发酵液中还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸 (DNS 法) [72]。

(1) 原理: 在碱性条件下, 还原糖与 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 共热, 3,5-二硝基水杨酸被还原为 3-氨基-5-硝基水杨酸 (棕红色物质), 还原糖则被氧化成糖酸及其它产物。在一定范围内, 还原糖的量与棕红色物质颜色深浅的程度成一定的比例关系, 在 540nm 波长下测定棕红色物质的消光值。

(2) 1mg/mL 葡萄糖标准液: 准确称取 100mg 分析纯葡萄糖 (预先在 80℃烘至恒重), 置于小烧杯中, 用少量蒸馏水溶解后, 定量转移到 100mL 的容量瓶中, 以蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 冰箱中保存备用。

(3) 3,5-二硝基水杨酸试剂: 将 6.3g 3,5-二硝基水杨酸和 262mL 2mol/L NaOH 溶液, 加到 500mL 含有 185g 酒石酸钾钠的热水溶液中, 再加 5g 结晶酚和 5g 亚硫酸钠, 搅拌溶解。冷却后加蒸馏水定容至 1000mL, 贮于棕色瓶中备用。

(4) 制作葡萄糖标准曲线: 取 7 支 25mL 刻度试管, 编号 0~6, 分别量取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mL 葡萄糖标准溶液于 7 支试管中, 并用蒸馏水补至 2.0mL, 然后各加入 DNS 试剂 1.5mL。将各管摇匀, 在沸水浴中加热 5 min, 取出后立即冷却至室温, 再以蒸馏水定容至 25mL, 混匀。在 540nm 波长下, 用 0 号管调零, 分别读取 1~6 号管的吸光度。以吸光度为纵坐标, 葡萄

糖毫克数为横坐标，绘制标准曲线（图 3-1）。在 0.2~1.0mg 范围内，葡萄糖的标准曲线方程为：

$$y=0.5819x-0.0002, \text{ 其相关系数 } R^2=0.9987.$$

(5) 样品还原糖测定：取一支 25mL 刻度试管，加入 2mL 适当稀释的样品液，再加入 1.5mL 3,5-二硝基水杨酸试剂，其余操作均与制作葡萄糖标准曲线时相同。通过标准曲线查得还原糖含量。

3.1.6.3 生物量的测定^[73]

将发酵液过滤，得菌丝体，用稀盐酸或去离子水洗 2~3 次除去残留的 CaCO_3 ，置 60 °C~80 °C 的干燥箱中烘干至恒重。

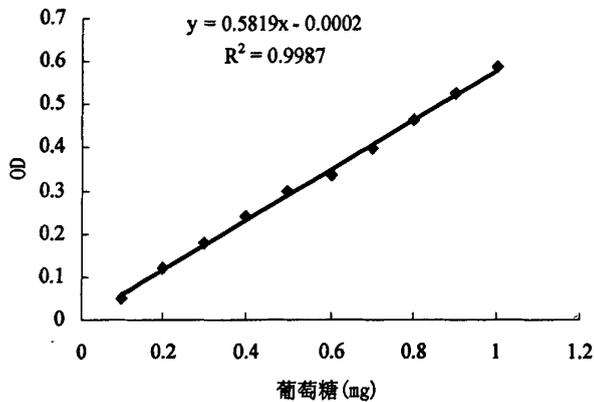


图 3-1 还原糖含量标准曲线

Fig. 3-1 Standard curve of glucose content

3.2 实验方案

3.2.1 pH值对米根霉菌体生长影响的研究

使用氨水作为中和剂，通过7L罐发酵确定米根霉最适生长pH值。采用最适培养基成分进行发酵，流加氨水使发酵罐中pH值分别稳定在 5.0 ± 0.2 、 5.5 ± 0.2 、 6.0 ± 0.2 ，期间考察米根霉菌体生长状态，72h后测定L-乳酸产量。以L-乳酸产量为指标，确定最佳pH值。

3.2.2 中和剂浓度对L-乳酸产量的影响

在最适培养基成分基础上，分别选取2mol/L、4mol/L、6mol/L、8mol/L、10mol/L、12mol/L NaOH溶液和5%、10%、15%、20%、25%氨水溶液来控制发酵液的pH值，在7L发酵罐上连续发酵72h，以L-乳酸产量为指标来确定最佳NaOH溶液和氨水溶液浓度；分别选取40g/L、50g/L、60g/L、70g/L和80g/L CaCO_3 进行摇瓶发酵72h，以L-乳酸产量为指标，确定最佳 CaCO_3 添加量。

3.2.3 中和剂对米根霉菌体形态的影响

在最适中和剂浓度前提下,对米根霉菌体的形态进行考察,比较分别使用NaOH溶液、氨水溶液、CaCO₃作为中和剂时菌体形态的不同。

3.2.4 米根霉发酵产L-乳酸动力学研究

在最适中和剂浓度基础上,分别使用NaOH溶液、氨水溶液、CaCO₃作为中和剂在7L发酵罐中进行发酵,装液量5L。发酵期间参数控制如下:(1)通气和搅拌:通气量15L/min,搅拌转速300r/min。(2)pH值:自动流加中和剂控制在5.5±0.2左右。(3)发酵温度:32±0.5℃。分别在0h、6h、12h、18h、24h、30h、36h、42h、48h、54h、60h、66h、72h取样,测定发酵液中L-乳酸含量、残糖量及生物量,绘制动力学曲线。

3.2.5 半连续发酵试验方法

在最适中和剂浓度基础上,流加NaOH溶液、氨水溶液作为中和剂在7L发酵罐上进行半连续发酵。首批发酵72h,发酵结束后,停止搅拌使菌体沉降于发酵罐底部,通气使发酵罐保压在0.1MPa左右,将发酵液从取料口压出,通过补料口补入灭菌后的新鲜培养基继续发酵24h,参数控制如首批发酵,如此重复发酵7批次。

3.3 结果与讨论

3.3.1 最适pH值确定

在发酵罐中,通过自动流动中和剂将pH分别控制在5.0±0.2、5.5±0.2、6.0±0.2,考察了pH值对米根霉菌体形态和L-乳酸产量的影响。如表3-1所示。

表 3-1 pH 值对菌体形态和产酸量的影响

Fig.3-1 Effect of pH on morphology and L-lactic acid production

pH值	菌体形态	菌球形成时间 (h)	生物量(g/L)	L-乳酸产量 (g/L)
5.0±0.2	菌球(2~3mm)	24h	8.16±0.85	57.35±0.95
5.5±0.2	菌球(1~2mm)	36h	9.22±0.76	80.61±1.02
6.0±0.2	菌球(1~2mm)	36h	8.63±0.49	72.68±0.68

由表3-1所示,pH为5.0±0.2时菌球形成时间24h,pH为5.5±0.2、6.0±0.2时菌球形成时间都为36h,pH为5.0±0.2时菌球相对较大,会影响溶氧传质,且pH值偏小会抑制菌体生长及L-乳酸的生成,此时L-乳酸产量仅为57.35g/L;当pH为5.5±0.2、6.0±0.2时菌球均为1~2mm,但pH为5.5±0.2时L-乳酸产量为80.61g/L,因此选取pH为5.5±0.2为米根霉最适生长pH值。

3.3.2 中和剂浓度对L-乳酸产量的影响

3.3.2.1 NaOH浓度对L-乳酸产量的影响

在7L发酵罐中对NaOH浓度进行优化,结果如图3-2;在2~10mol/L范围内,L-乳酸产量随着NaOH浓度增大而增多,分析可能由于在低浓度范围内,流加NaOH过多导致发酵罐内体积增多使L-乳酸被稀释,且NaOH产生的渗透压不利于米根霉菌体生长和L-乳酸生成;而超过10mol/L时L-乳酸产量下降,可能是随着NaOH浓度的增加,碱性增强,流加时发酵罐内局部碱性很大,对菌体的毒害作用增强,导致部分菌体死亡,有效菌体量减少,从而使L-乳酸产量相应减少,因此选择10mol/L为最佳浓度,在此浓度下L-乳酸产量为74.34g/L。

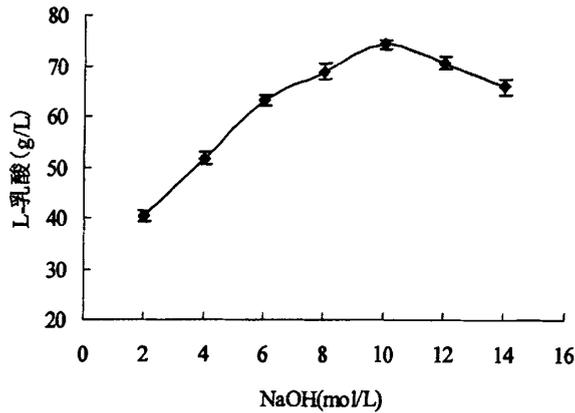


图 3-2 NaOH 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.3-2 Effect of the connection of NaOH on L-lactic acid production

3.3.2.2 氨水质量分数对L-乳酸产量的影响

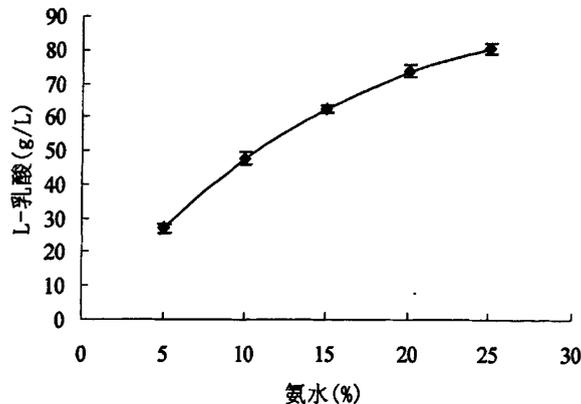


图 3-3 氨水浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.3-3 Effect of the connection of $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ on L-lactic acid production

在7L发酵罐中对氨水质量分数进行优化,结果如图3-3;随着氨水质量分数的增加,L-乳酸产量不断上升,分析可能因为氨水不仅能中和发酵产生的L-乳

酸，还可以作为氮源促进米根霉菌体的生长，L-乳酸的产生导致发酵罐内pH值下降，氨水流加进入发酵罐，发酵液中 NH_4^+ 浓度不断增加， NH_4^+ 一部分作为氮源供米根霉菌体生长所用，一部分中和L-乳酸产生L-乳酸铵。因此氨水可能是米根霉发酵产L-乳酸比较理想的中和剂。由于市面所售氨水最高质量分数为25%，因此选择25%氨水，此浓度下L-乳酸产量为80.61g/L。

3.3.2.3 CaCO_3 浓度对 L-乳酸产量的影响

通过在摇瓶中添加不同浓度的 CaCO_3 来考察 CaCO_3 浓度对L-乳酸产量的影响， CaCO_3 浓度分别取30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L和90g/L，结果如图3-4所示。L-乳酸产量随着 CaCO_3 浓度的增加呈现先上升后下降趋势，在30~60g/L范围内，L-乳酸产量不断上升，因为 Ca^{2+} 不但能增进菌体的生长，而且能通过影响钙调素来参与菌丝顶端生长的极性和分支的调节作用，从而使L-乳酸增产；在60~90g/L范围内，L-乳酸产量开始下降，因为 CaCO_3 浓度过高，使得一部分菌球呈块状，影响溶氧传质，导致有效菌体变少，L-乳酸产量下降。

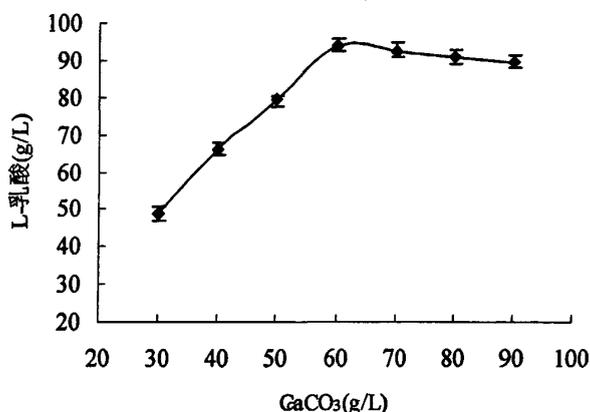


图 3-4 CaCO_3 浓度对 L-乳酸产量的影响

Fig.3-4 Effect of the connection of CaCO_3 on L-lactic acid production

3.3.3 中和剂对菌体形态的影响

使用10mol/LNaOH、25% $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 作为米根霉发酵产L-乳酸的中和剂，在7L发酵罐发酵72h，发酵液澄清透明，米根霉菌体形成菌丝体小球，无任何包埋现象，而使用 CaCO_3 作为中和剂时，发酵液比较浑浊且菌体 CaCO_3 包埋现象严重，当发酵进行到54h时，发酵罐中乳酸钙含量过多，出现固化现象，使发酵无法继续。其中氨水作为中和剂时，米根霉的菌体形态较为适合，NaOH作为中和剂时菌球偏小， CaCO_3 作为中和剂时菌体大部分呈球状，有一部分出现块状。如表3-2所示。

表 3-2 不同中和剂对菌体形态的影响

Table 3-2 Effect of neutralizers on morphology

中和剂	菌体形态	菌球形成时间 (h)	生物量 (g/L)
NaOH	菌球 (0.2~1.2mm)	24h	9.48±0.45
NH ₃ ·H ₂ O	菌球 (1.2~2.2mm)	30h	9.69±0.58
CaCO ₃	菌球 (0.8~1.8mm)	24h	10.23±0.36
NaOH+CaCO ₃	菌球 (1.0~2.0mm)	30h	9.81±0.27
NH ₃ ·H ₂ O+CaCO ₃	菌球 (1.5~2.5mm)	30h	9.98±0.52

一般在发酵初期的前24h,米根霉菌体呈絮状,24-30h后开始形成菌丝体小球,由实验可知,添加CaCO₃后菌体生长旺盛,但易发生包埋现象,发酵终点米根霉菌丝体小球形态如图3-5所示。

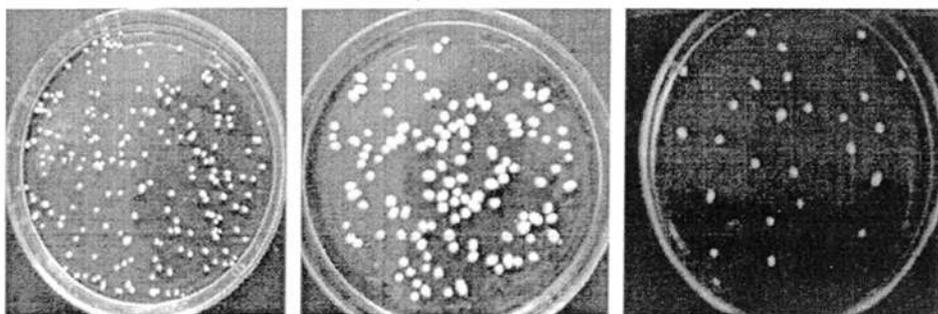


图 3-5 NaOH、NH₃·H₂O、CaCO₃ 作为中和剂时的菌球形态

Fig.3-5 Pellet of using NaOH、NH₃·H₂O、CaCO₃ as the neutralizer

3.3.4 单一中和剂的发酵动力学

3.3.4.1 NaOH为中和剂时的发酵动力学

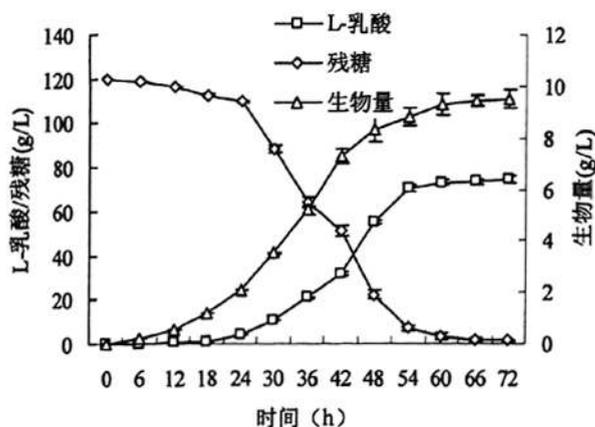


图 3-6 以 NaOH 作为中和剂的发酵动力学曲线

Fig.3-6 Curve of using NaOH as a neutralizer fermentation kinetics

测定发酵液中的米根霉生物量、残糖量和L-乳酸浓度,得出以10mol/LNaOH

溶液作为米根霉发酵产L-乳酸中和剂的动力学，如图3-6所示，米根霉菌体的生长曲线和L-乳酸的生成曲线都呈S形。发酵初期0-24h，以菌体的生长为主，产酸很少，葡萄糖消耗速度缓慢。24h后进入产酸旺盛期，L-乳酸的合成与米根霉菌体的生长同步，L-乳酸产量增加的趋势与米根霉菌丝体增长的趋势基本一致，葡萄糖的消耗速度加快。54h后菌丝体含量变化不大，耗糖速度和产酸均变缓慢，发酵进入稳定期，72h发酵结束，L-乳酸的产量达到峰值。

3.3.4.2 氨水为中和剂时的发酵动力学

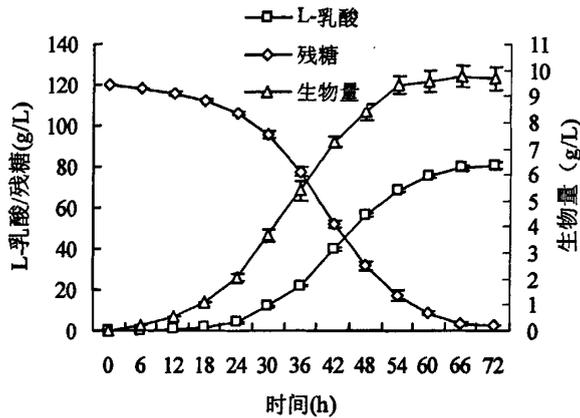


图 3-7 以氨水作为中和剂的发酵动力学曲线

Fig.3-7 Curve of using ammonia as a neutralizer fermentation kinetics

测定发酵液中的米根霉生物量、残糖量和L-乳酸浓度，即研究以25%氨水作为米根霉发酵产L-乳酸中和剂的菌体生长、糖代谢和产酸动力学。由图3-7可知，米根霉菌体的生长曲线和L-乳酸的生成曲线都呈S形，糖消耗曲线呈反S形。发酵初期12h，菌体生长缓慢，菌丝体含量与L-乳酸产量很少。24h至60h进入米根霉生长与生产旺盛期，菌体迅速生长，葡萄糖的消耗速度加快，L-乳酸产量也随之迅速增加。60h后进入稳定期，L-乳酸增加缓慢，72h发酵结束，L-乳酸产量达最高值。

3.3.4.3 以CaCO₃作为中和剂的发酵动力学初步研究

测定发酵液中的米根霉生物量、残糖量和L-乳酸浓度，研究以60g/L CaCO₃作为米根霉发酵产L-乳酸中和剂的菌体生长、糖代谢和产酸动力学，如图3-8所示。以CaCO₃作为中和剂时，在发酵初期18h，菌体生长缓慢，24h到42h，菌体进入对数生长期，葡萄糖迅速消耗，42h后，菌体生长进入稳定期，54h时出现固化现象，发酵不能继续，此时L-乳酸产量达到75.8g/L，发酵强度为1.40g/(L·h)。

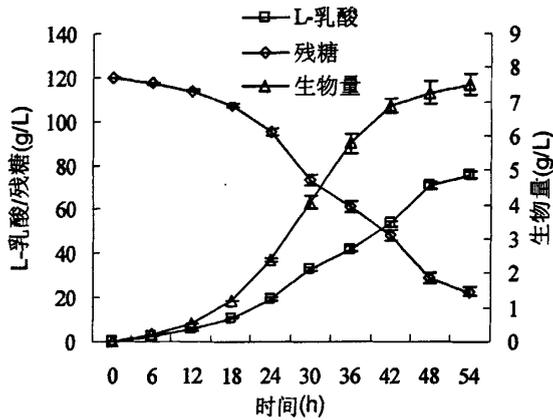


图 3-8 以 CaCO₃ 作为中和剂的发酵动力学曲线

Fig.3-8 Curve of using CaCO₃ as the neutralizer fermentation kinetics

3.3.5 复合中和剂的发酵动力学

3.3.5.1 NaOH 和 CaCO₃ 复合中和剂的发酵动力学

发酵开始时先加入 100gCaCO₃，当 pH 值下降到 5.5±0.2 以下时，开始流加 10mol/LNaOH 溶液，将发酵液 pH 始终控制在 5.5±0.2 左右，每隔 6h 取样，测定发酵液中的 L-乳酸含量、残糖量和生物量，绘制动力学曲线。

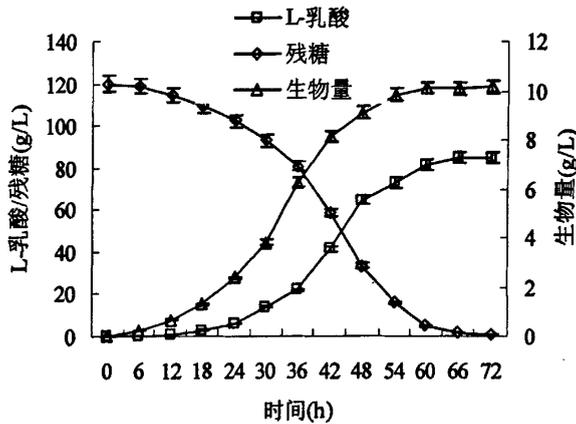


图 3-9 NaOH 和 CaCO₃ 复合中和剂的发酵动力学

Fig.3-9 Curve of NaOH and CaCO₃ composite neutralizer fermentation kinetics

如图 3-9 所示，24h 前，菌体生长缓慢，几乎不生成 L-乳酸，葡萄糖消耗量很少；24h-48h，菌体生长旺盛，L-乳酸产量迅速上升，葡萄糖消耗快速。48h 后，菌体生长变缓，L-乳酸产量也进入稳定期，72h 时 L-乳酸产量达到最高达 84.77g/L。

3.3.5.2 氨水和 CaCO₃ 复合中和剂的发酵动力学

发酵开始时先加入 100gCaCO₃，当 pH 值下降到 5.5±0.2 以下时，开始流加

25%氨水溶液，将发酵液 pH 始终控制在 5.5 ± 0.2 左右，每隔 6h 取样，测定发酵液中的 L-乳酸含量、残糖量和生物量，绘制动力学曲线。

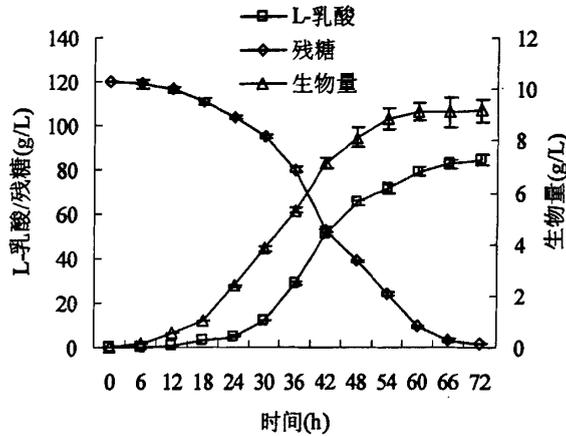


图 3-10 氨水和 CaCO_3 复合中和剂的发酵动力学

Fig.3-10 Curve of ammonia and CaCO_3 composite neutralizer fermentation kinetics

如图 3-10 所示，在发酵初期的 18h 前，菌体生长缓慢，L-乳酸生成量很少；18h-54h，菌体进入对数生长期，L-乳酸快速累积，葡萄糖快速消耗。54h 后，菌体开始平稳生长，L-乳酸产量进入稳定期，发酵终点时 L-乳酸产量达到最高 85.22g/L。

3.3.6 不同中和剂的半连续发酵

半连续发酵是指在发酵过程的后期周期性地放出部分含有产物的发酵液，然后再补加相同体积的新鲜培养基的发酵方法，即首批发酵结束后取出部分发酵液并补加新鲜培养基进行重复发酵。将半连续发酵工艺应用到米根霉产 L-乳酸的发酵中，提高米根霉菌体的利用率，大大缩短发酵周期，从而提高 L-乳酸发酵强度。

3.3.6.1 以 NaOH 溶液作为中和剂的半连续发酵

以 NaOH 溶液作为中和剂实现米根霉发酵产 L-乳酸的半连续发酵，结果如图 3-11 所示。

首批发酵 72h 后 L-乳酸产量为 75.34g/L，发酵强度为 1.05 g/(L·h)。首批发酵结束后，取出发酵液，补入灭菌后的新鲜发酵液发酵 24h，重复发酵 6 批次。L-乳酸的产量随着发酵批次呈下降趋势，第 5 批次到第 7 批次处于相对稳定的状态，随着发酵的进行，发酵液颜色由淡黄色变成深黄色，菌球变大部分呈块状。综合计算 7 批次的平均发酵强度为 1.53g/(L·h)，高于首批发酵强度。

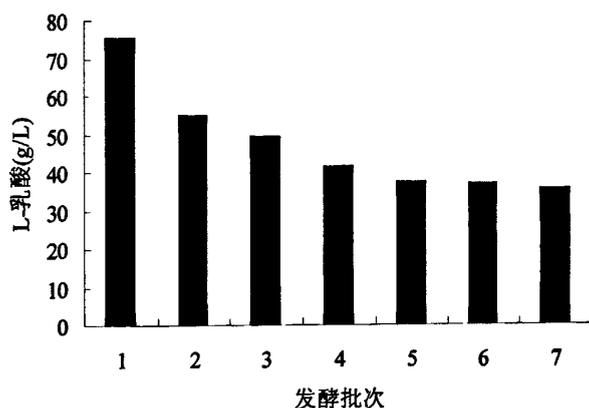


图 3-11 以 NaOH 作为中和剂的半连续发酵

Fig.3-11 Repeated intermittent fermentation with NaOH as the neutralizer

3.3.6.2 以氨水作为中和剂的半连续发酵

流加 25%氨水控制 pH 值在 5.5 ± 0.2 来中和发酵生成的 L-乳酸，首批发酵 72h，取出发酵液，注入灭菌后新鲜的培养基发酵 24h，重复 6 批次，结果如图 3-12 所示。

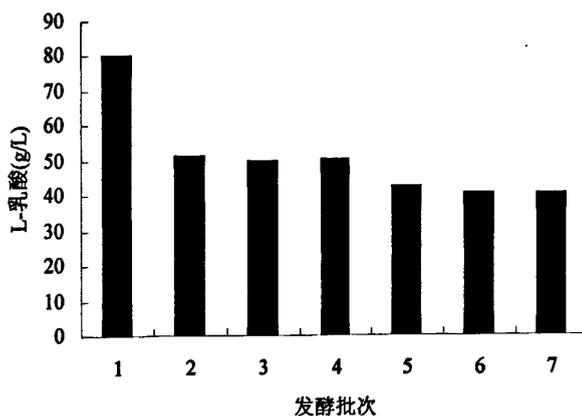


图 3-12 以氨水作为中和剂的半连续发酵

Fig.3-12 Repeated intermittent fermentation with ammonia as the neutralizer

首批发酵 72h，发酵终点时测得 L-乳酸产量为 80.45g/L，葡萄糖转化率为 67.04%，发酵强度为 1.12g/(L·h)。从第 2 批次开始，每批次发酵 24h，检测每批次 L-乳酸产量，综合计算半连续发酵 7 批次平均产酸强度为 1.65 g/(L·h)，高于分批发酵强度。观察到重复批次发酵的米根霉菌体颜色逐渐变深，块状菌体数量变多，部分菌体漂浮破裂，发酵液颜色也逐渐加深。

3.4 本章小结

通过 7L 罐发酵考察了米根霉菌种的最适生长 pH 值，研究了使用 NaOH 溶液、氨水作为中和剂时的最适浓度和发酵动力学，并实现了以 NaOH 溶液、氨水作为中和剂的半连续发酵。

(1) 米根霉发酵产 L-乳酸的最适 pH 为 5.5 ± 0.2 ，当发酵液中 pH 为 5.5 ± 0.2 时，米根霉菌体生长良好，有利于形成大小合适的菌球，从而利于 L-乳酸的生成。

(2) Ca^{2+} 在米根霉菌体生长过程中起非常重要作用，其中 CaCO_3 优于 CaCl_2 ，利用 NaOH 和氨水作为米根霉发酵产 L-乳酸的中和剂时，添加了 CaCO_3 后 L-乳酸产量平均提高 7.3 倍。

(3) 氨水作为米根霉发产 L-乳酸中和剂的最佳质量分数为 25%，NaOH 溶液作为米根霉发产 L-乳酸中和剂的最佳浓度为 10mol/L， CaCO_3 作为米根霉发产 L-乳酸中和剂的最佳添加量为 60g/L，在最佳条件下进行 7L 罐发酵，L-乳酸产量分别达到 74.34g/L、80.61g/L、75.8g/L，发酵强度为 1.03g/(L·h)、1.12g/(L·h)、1.40g/(L·h)。复合中和剂的 L-乳酸产量均比单一中和剂高，可以得出 CaCO_3 对 L-乳酸产量的提高有着很大作用。

(4) 以氨水、NaOH 溶液作为中和剂，实现了液体中和剂的半连续发酵，发酵产酸强度均高于分批发酵。

第四章 不同中和剂条件下发酵产 L-乳酸的代谢通量分析

细胞是生命活动的基本功能单位。生命的代谢活动是通过活细胞和细胞群的代谢网络进行的，后者有一系列酶催化的级联化学反应以及特异性的膜转移系统所构成^[53]。微生物本身在代谢繁殖过程中经济合理地利用和合成自身所需的各种物质和能量，使细胞处于平衡生长状态，同时人类却利用微生物进行自身积累生物物质或代谢产物。微生物细胞这种自身固有的代谢网络相对实际应用而言，其遗传特性并非最佳。由于微生物菌种本身遗传特性的限制，通过优化生产工艺条件难以大幅度提高产物的产率。为了大量积累某种代谢产物，就必须打破微生物原有的平衡状态。传统的方法是应用诱变技术选育具有特定生产性状的微生物或通过控制环境条件使其适于细胞的生长和产物合成，但传统的诱变方法的缺点是由于诱变剂作用的非专一性而导致基因突变的不可预见性。随着对微生物生理、生化研究的深入及基因工程技术的日臻完善，人们通过基因克隆技术和应用分析生物学相关的遗传学手段进行有精确目标的基因操作改变微生物代谢途径的某些关键步骤，实现目的基因代谢活性的提高，从而提高代谢物的产率；或通过基因重组技术改变微生物的代谢途径以生产传统发酵工业无法获得的新产品。人们把这种涉及多种基因的基因工程称为代谢工程，也称为途径工程^[54-56]。

在代谢工程的基础研究中，目前应用最为广泛的方法是代谢通量分析（Metabolic flux analysis, MFA）。MFA可以根据已知代谢网络的输入输出量确定代谢网络各途径的通量。MFA最大的优点是不需要知道代谢途径中各种酶的动力学特征就可以得到关于微生物代谢的许多重要信息。对于一个已知的过程，MFA可以直接用来确定合成产物的代谢流量的分布，考察过程条件对代谢通量改变的影响，可以预测另外增加新的途径对整个系统的影响。

4.1 米根霉菌体代谢网络的建立

Wright等应用¹⁴C放射性同位素标记的方法确定了米根霉体内的代谢网络，如图4-1所示^[67]。据Wright报道，米根霉体内存在两个丙酮酸代谢库：一个存在于原生质内，丙酮酸分别转化为乙醇、乳酸、草酰乙酸、苹果酸和富马酸；另一个存在于线粒体内，丙酮酸转化为辅酶A进入三羧酸（TCA），产生富马酸和苹果酸。因此，胞内同时存在两个富马酸和苹果酸代谢库。Wright经过实验证明胞外累积的苹果酸和富马酸由第一个丙酮酸代谢库产生^[66]。

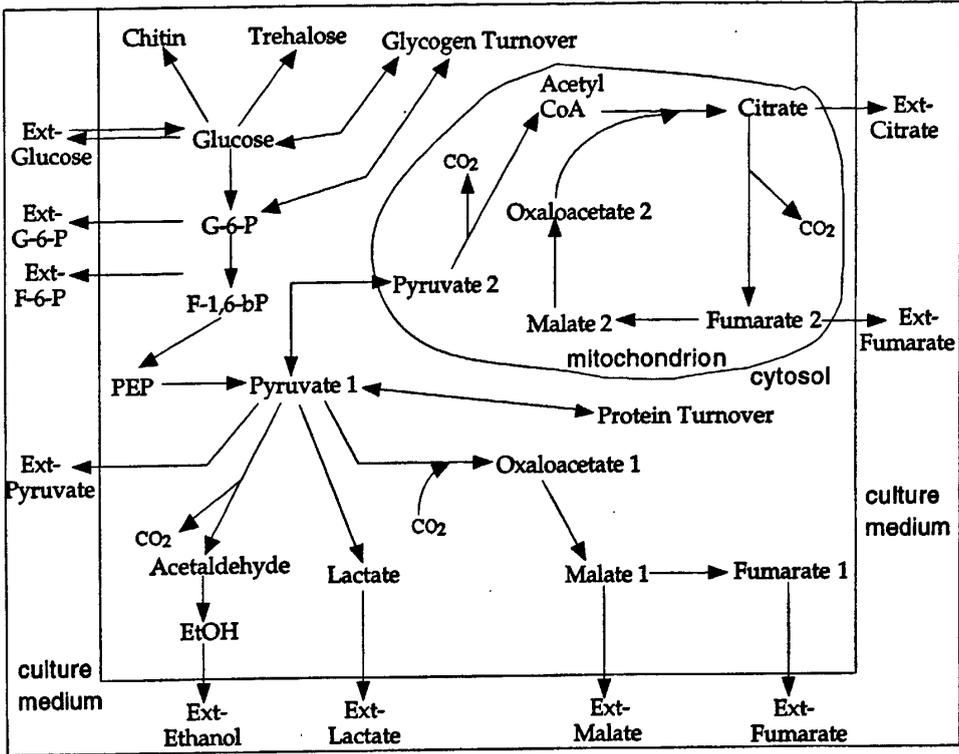


图 4-1 米根霉体内的代谢网络图

Fig.4-1 Map of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae*

米根霉菌体整个代谢网络的反应方程见表4-1所示^[22]。

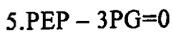
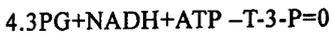
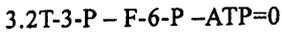
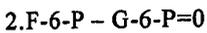
表 4-1 米根霉胞内代谢反应方程

Table 4-1 The metabolic reaction equations of *Rhizopus oryzae*

底物利用反应:

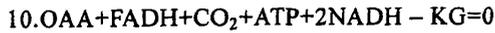


EMP途径反应:

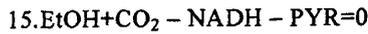
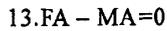
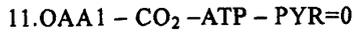


TCA循环途径反应:

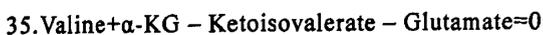
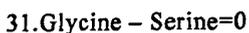
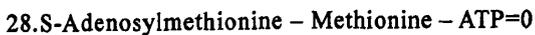
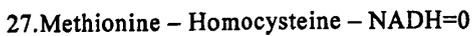
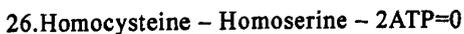
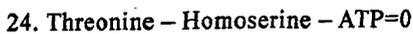
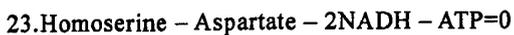
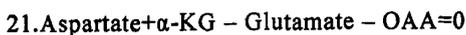
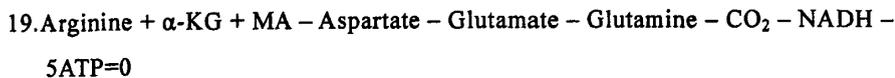
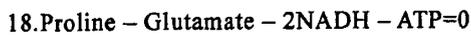
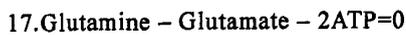




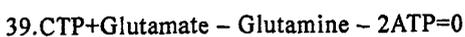
乳酸、乙醇及其它微量酸的合成反应:



氨基酸的合成反应:



核苷酸的合成反应



40. $5\text{'-Aminoimidazole} - 4\text{-carboxamide} - \text{ribonucleotide} +$

$2\text{Glutamate} + \text{MA} + \text{NADH} - \text{Aspartate} - 2\text{Glutamine} - 4\text{ATP} - \text{Glycine} = 0$

41. $\text{IMP} + \text{NADH} - 5\text{'-Aminoimidazole} - 4\text{-carboxamide} - \text{ribonucleotide} = 0$

42. $\text{Adenosinetriphosphate} + \text{MA} - \text{Aspartate} - \text{IMP} - 3\text{ATP} = 0$

43. $\text{GTP} + \text{Glutamate} + \text{NADH} - \text{Glutamine} - 4\text{ATP} - \text{IMP} = 0$

胞内生物大分子的合成反应:

44. $\text{Protein} - 0.095\text{Alanine} - 0.044\text{Argine} - 0.046\text{Asparagine} - 0.046\text{Aspartate} -$

$0.011\text{Cysteine} - 0.080\text{Glutamate} - 0.080\text{Glutamine} - 0.094\text{Glycine} - 0.020\text{Histidine}$
 $- 0.045\text{Isoleusine} - 0.069\text{Leusine} - 0.057\text{Lysine} - 0.014\text{Methionine} - 0.047\text{Proline} -$
 $0.066\text{Serine} - 0.048\text{Threonine} - 0.064\text{Valine} = 0$

45. $\text{RNA} - 0.256\text{Adenosine triphosphate} - 0.196\text{CTP} - 0.286\text{GTP} - 0.262\text{UTP} - \text{ATP} = 0$

46. $\text{DNA} - 0.242\text{Adenosine triphosphate} - 0.258\text{CTP} - 0.258\text{GTP} - 0.242\text{UTP} -$
 $1.242\text{NADH} - \text{ATP} = 0$

47. $\text{Lipid} + 1.1\text{S-Adenosylcysteine} + 3.8\text{CO}_2 - 18.12\text{AcCoA} - 18\text{ATP} - 0.623\text{T-3-P} -$

$0.623\text{FADH} - 0.3\text{G-3-P} - 24.1\text{NADH} - 1.1\text{S-Adenosylmethionine} - 0.4\text{Serine} -$
 $2.6\text{O}_2 = 0$

48. $\text{Carbohydrate} - \text{G-6-P} - \text{ATP} = 0$

49. $\text{Chitin} + \text{Glutamate} - \text{AcCoA} - \text{G-6-P} - \text{Glutamine} - 2\text{ATP} = 0$

50. $\text{Mannitol} - \text{F-6-P} - \text{NADH} = 0$

51. $\text{Glycerol} - \text{T-3-P} - \text{FADH} = 0$

电子传/氧化磷酸化反应及菌体维持:

52. $2.6\text{ATP} - \text{NADH} - 0.5\text{O}_2 = 0$

53. $1.6\text{ATP} - \text{FADH} - 0.5\text{O}_2 = 0$

54. $-\text{ATP} = 0$

米根霉菌体胞内代谢反应众多,为了计算方便,进行了一些合理的假设,主要包括以下几点:

(1) 菌体的组分,如DNA, RNA, 蛋白质等生物大分子的合成途径采用Pedersen建立的有关米曲霉的模型反应,仅包括胞内主要代谢物质的途径反应。

(2) 菌体组成部分(包括DNA, RNA, 蛋白质, 氨基酸等)的含量假定为不变的。由于缺乏米根霉菌体组分的数据,本文采用了Pedersen通过测定得到的米曲霉的有关数据,由此带来的误差可以忽略不计,这是因为一般菌体组分中的RNA, DNA和几种主要氨基酸的含量相差很小,而且这些组分含量较小,即使有变化,对模型的通量分布的影响也不大^[74]。

(3) 由于胞外累积的苹果酸和富马酸由第一个丙酮酸代谢库产生,模型中只包

括一条丙酮酸羧化酶催化产苹果酸和富马酸途经，而在三羧酸循环（TCA）途径中未标出。

（4）对于相互转化的两种物质A和B（没有第三种物质参与），模型中用一种物质C表示，例如，DHAP和G3P用T3P表示。

（5）为减少代谢网络中的反应数目，将直线性反应（无代谢分支的反应）归为一个代谢库（Metabolic pool）。

（6）假定胞内中间代谢物处于一种拟稳定。考虑到中间代谢物的过渡态相对于菌体生长速率和宏观操作条件的变化更为迅速，相对于菌体生长和发酵过程的过渡态而言，胞内中间物质的量相对不变，其累积速率为0。

（7）由于乙醇易挥发，且测量稳定性差，因此本文乙醇的含量假设为某一稳定值。

（8）由于同一个种的菌株在相似培养环境条件下，其细胞的生物组成应一致，因此细胞组成参考Mariat J^[75]与McKinlay JB^[76]的研究结论，单一化为 $\text{CH}_2\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ 统一处理^[77]。

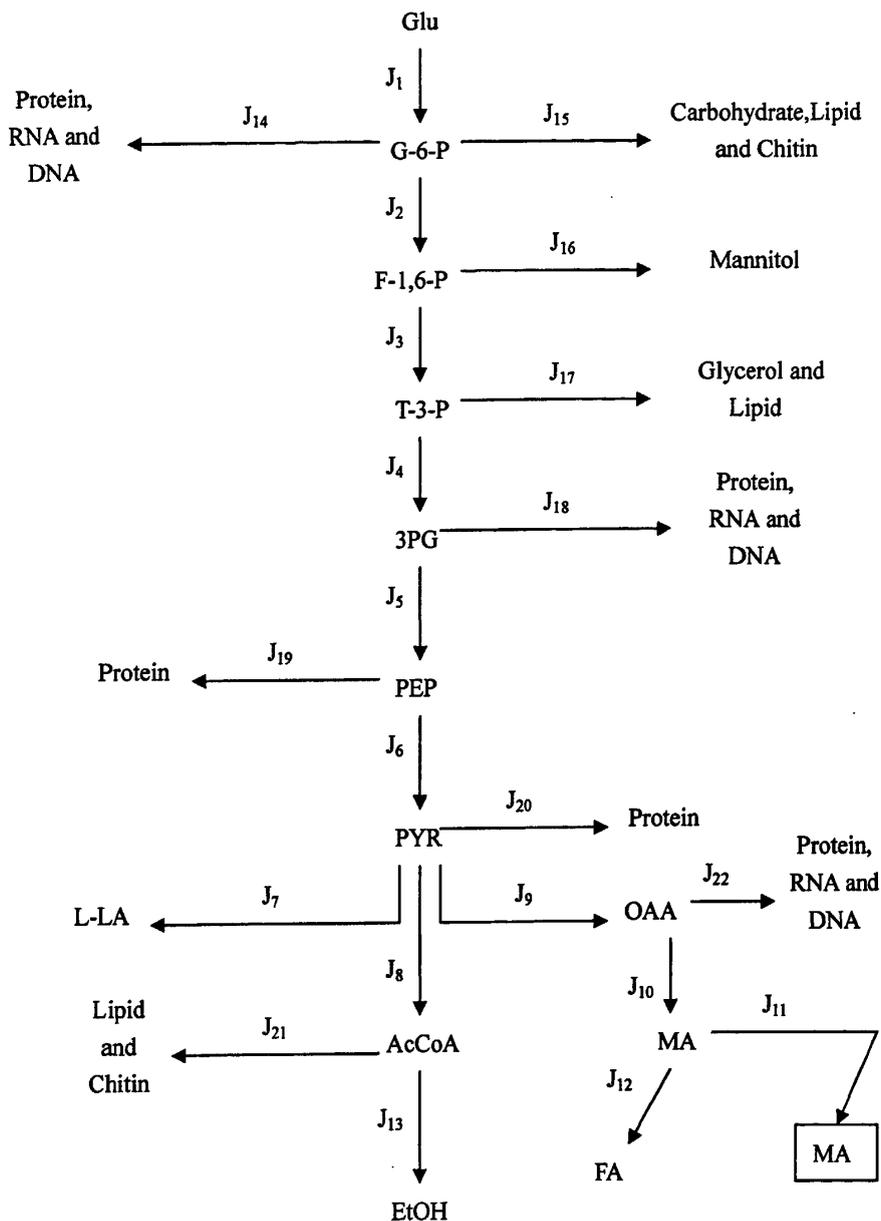


图 4-2 米根霉胞内主要代谢途径网络图

Fig.4-2 The central metabolic scheme for *Rhizopus oryzae*

4.2 材料与方法

4.2.1 菌种

米根霉As3.819(合肥工业大学生物与食品工程学院发酵实验室保藏菌种),保存在PDA培养基上,每2个月转接一次。孢子由PDA培养基产生,用无菌蒸馏水洗下孢子制成悬液。

4.2.2 试剂

同第三章。

4.2.3 主要设备

同第三章。

4.2.4 培养基

同第三章。

4.2.5 培养方法

同第三章。

4.2.6 检测方法

4.2.6.1 发酵液中 L-乳酸产量测定

采用 HPLC 法，同 2.1.6。

4.2.6.2 发酵液中苹果酸含量测定

采用 HPLC 法：

准确称取标准样苹果酸 0.4423g，用重蒸水定容到 100mL 容量瓶中，作为标样贮备液，然后分别从中吸取 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0mL，加入到 10mL 容量瓶中，定容，即为进样试液。分析时每次进样 20uL，每个浓度进样 5 次，取其平均值。在 4.42mg/L~39.81mg/L 范围内，以峰面积为 X，样液浓度为 Y，建立苹果酸标准曲线。苹果酸工作曲线的外标方程为：

$$Y=1E-06X-0.0011 \quad \text{其相关系数 } R^2=0.9998$$

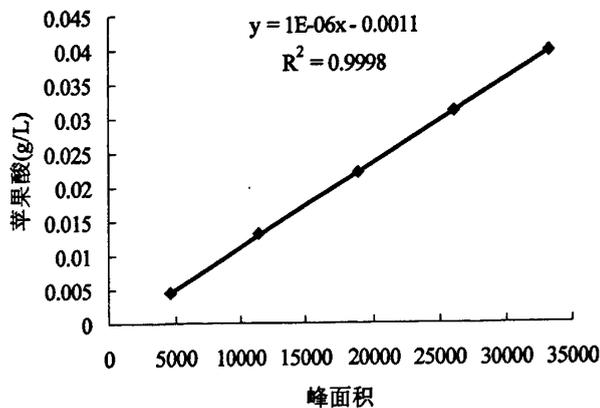


图 4-3 苹果酸标准曲线

Fig.4-3 Standard curve of malic acid content

4.2.6.3 发酵液中富马酸含量测定

准确称取标准样富马酸 0.0504g，用重蒸水定容到 100mL 容量瓶中，作为标样贮备液，然后分别从中吸取 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0mL，加入到 10mL 容量瓶中，定容，即为进样试液。分析时每次进样 20uL，每个浓度进样 5 次，取其平均值。在 0.50mg/L~4.54 mg/L 范围内，峰面积为 X，样液浓度为 Y，绘制标准曲线。富马酸工作曲线的外标方程为：

$$Y=8E-09X+0.0001 \quad \text{其相关系数 } R^2=0.998$$

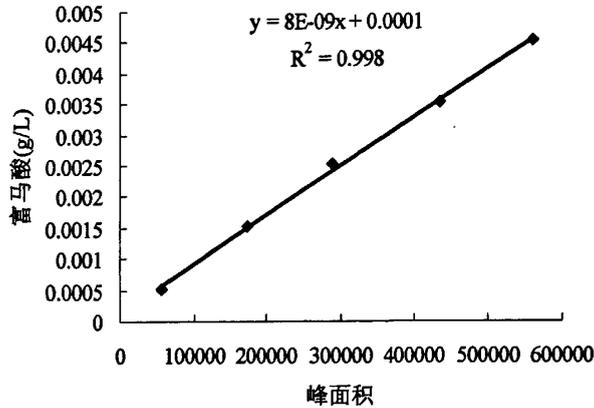


图 4-4 富马酸标准曲线

Fig.4-4 Standard curve of fumaric acid content

4.2.6.4 生物量的测定

同第三章。

4.3 结果与讨论

4.3.1 以NaOH溶液作为中和剂的代谢通量分析

米根霉菌体的发酵过程较长，一般可分为三个阶段。第一阶段为细胞生长的延滞期。在这个阶段，细胞生长、产物合成和底物消耗速率都较慢，一般为0-24h；第二阶段为细胞快速生长的对数期，在这一阶段，细胞生长、产物合成和底物消耗速率都较快，一般为24-54h；第三阶段菌体生长减慢，但产物合成则保持较快的速率，一般为54-72h。

在这里选取细胞生长和发酵产酸的三个时期，即第12h、36h、60h的实验数据，代入通量模型中求解，通量分布结果如图4-5所示。

通过图4-5的代谢通量结果可以发现，流量分析显示三个时期产物L-乳酸的流量速率分别是0.93mmol/g/h、2.05mmol/g/h和5.83mmol/g/h，说明单位时间内单位菌体的L-乳酸产量在不断增加，且增加幅度不断上升，稳定期的产酸速率明显大于对数生长期，而对数生长期的产酸速率大于延滞期。

代谢副产物苹果酸的流量速率在细胞生长初期为0.01mmol/g/h，相对L-乳酸来说不大，但是相对对数期和稳定期非常大，一方面可能此时苹果酸脱氢酶的活性较高，另一方面此时菌体合成量较大，在菌体成分生成的同时伴随着苹果酸的生成。36h处于细胞生长稳定期，此时苹果酸的流量速率显示为负值(-0.001 mmol/g/h)，表明此时代谢流的方向发生了改变，可能是此时碳源不足，苹果酸被菌体利用。富马酸的代谢流量速率也呈现不断上升的趋势，在发酵后期最大，表明富马酸水和酶在稳定期时活性增强。

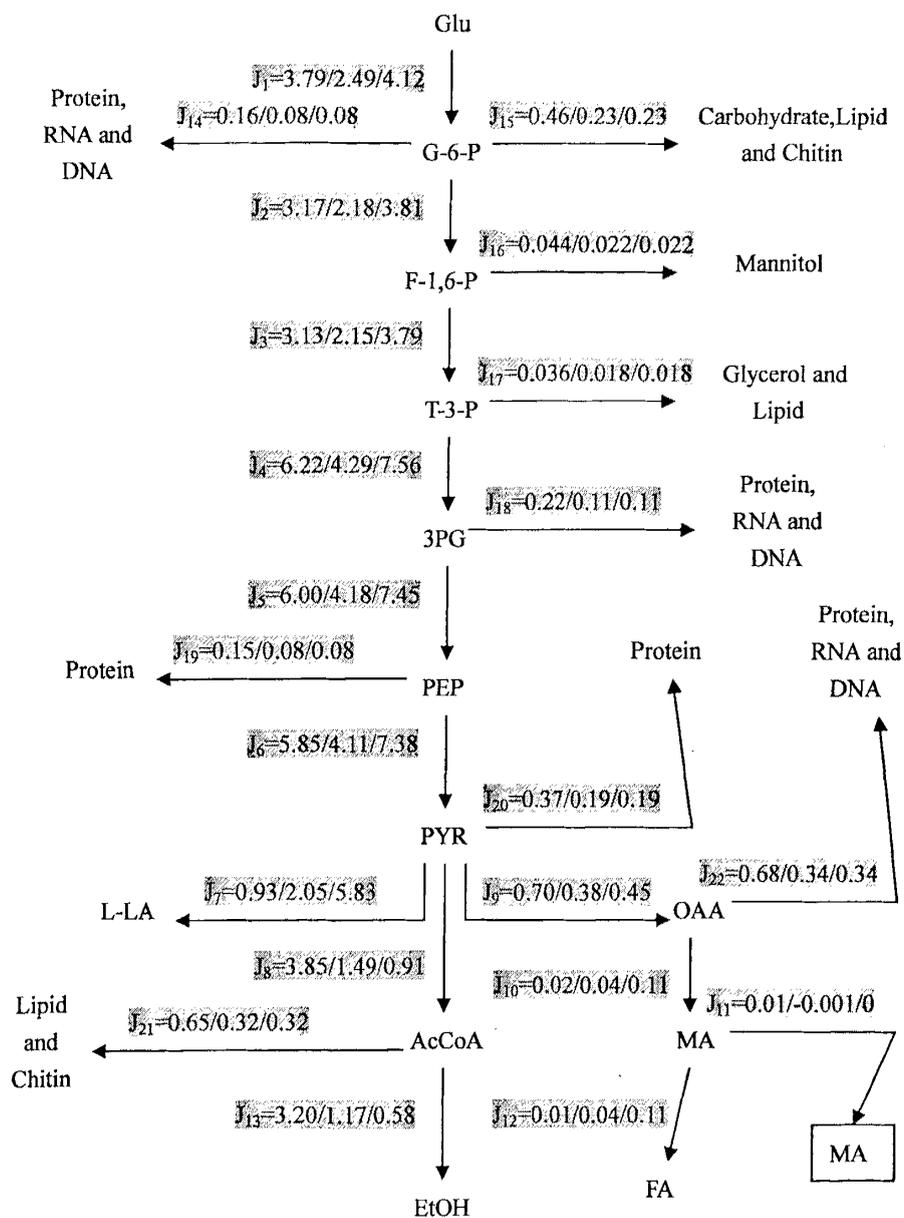


图 4-5 以 NaOH 作为中和剂进行发酵的代谢通量分析

Fig.4-5 Metabolic flux distribution of using NaOH as the neutralizer

4.3.2 以氨水作为中和剂的代谢通量分析

同4.4.1，以氨水作为中和剂时，选取第12h、36h、60h的实验数据，代入通量模型中求解，通量分布结果如图4-6所示。

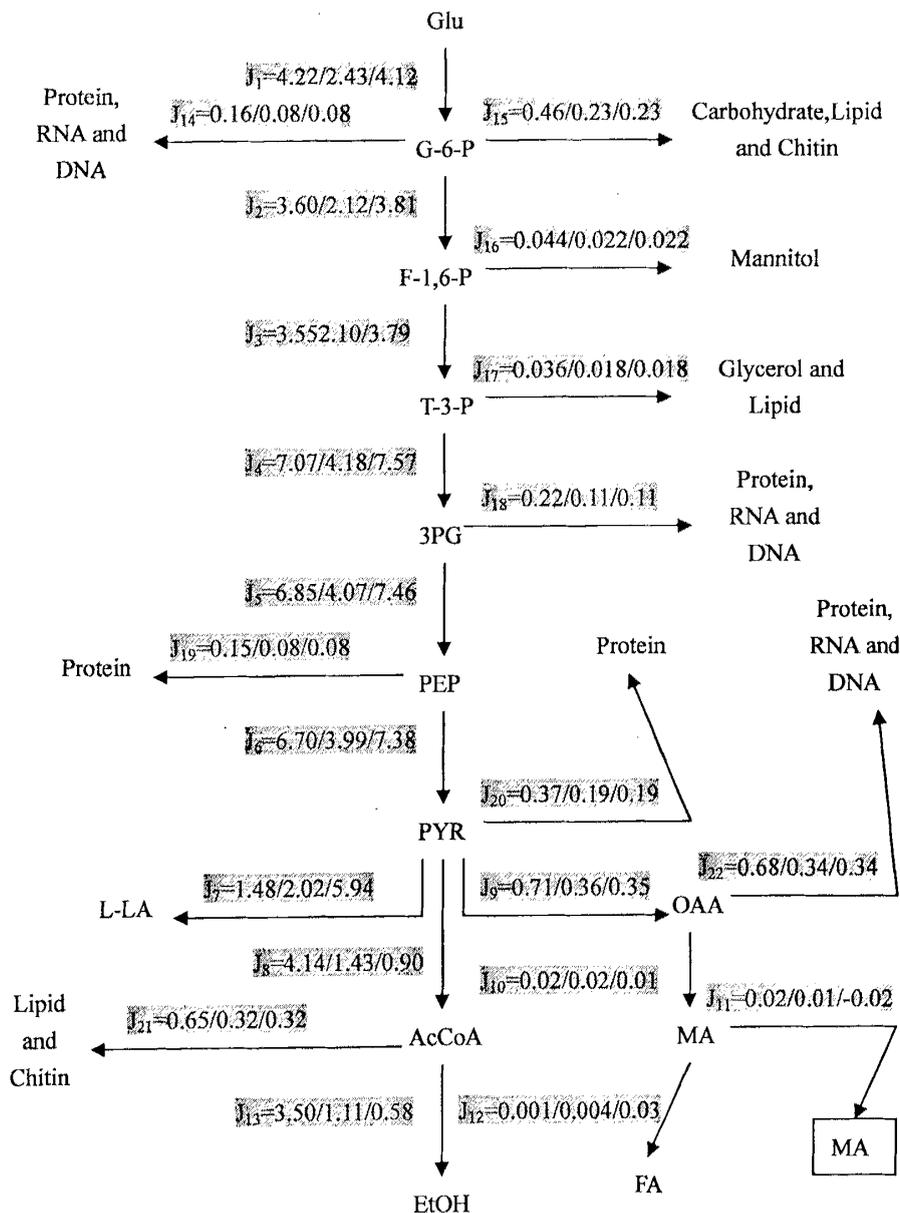


图 4-6 以氨水作为中和剂进行发酵的代谢通量分析

Fig.4-6 Metabolic flux distribution of using $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ as a neutralizer

以氨水作为中和剂时，第12h、36h、60h产物L-乳酸的流量速率分别为1.48mmol/g/h、2.02 mmol/g/h、5.94mmol/g/h，同以NaOH作为中和剂时一样，从细胞生长延滞期到对数生长期再到稳定期，L-乳酸的流量速率不断增大，但在细胞开始生长时和稳定期，氨水作为中和剂时的流量速率都较之NaOH大，因此验证了以氨水作为中和剂时的L-乳酸产量较高。

相对NaOH溶液，以氨水作为中和剂时，副产物苹果酸的流量速率较大，第12h时为0.02mmol/g/h，是NaOH溶液为中和剂时的2倍；第36h时为0.01mmol/g/h，

而以NaOH溶液为中和剂时，此时为负值；但副产物富马酸的流量速率却较之很少。除了副产物苹果酸和富马酸之外，其他物质的流量速率都相差无几。

4.3.3 以CaCO₃作为中和剂时的代谢通量分析

使用CaCO₃作为中和剂，在发酵后期生成的粗乳酸钙易发生固化现象，使发酵难以继续。在7L发酵罐的发酵实验中，实验进行到54h便固化了，因此选取第12h、30h、48h的实验数据，代入通量模型中求解，通量流量如图4-7所示。

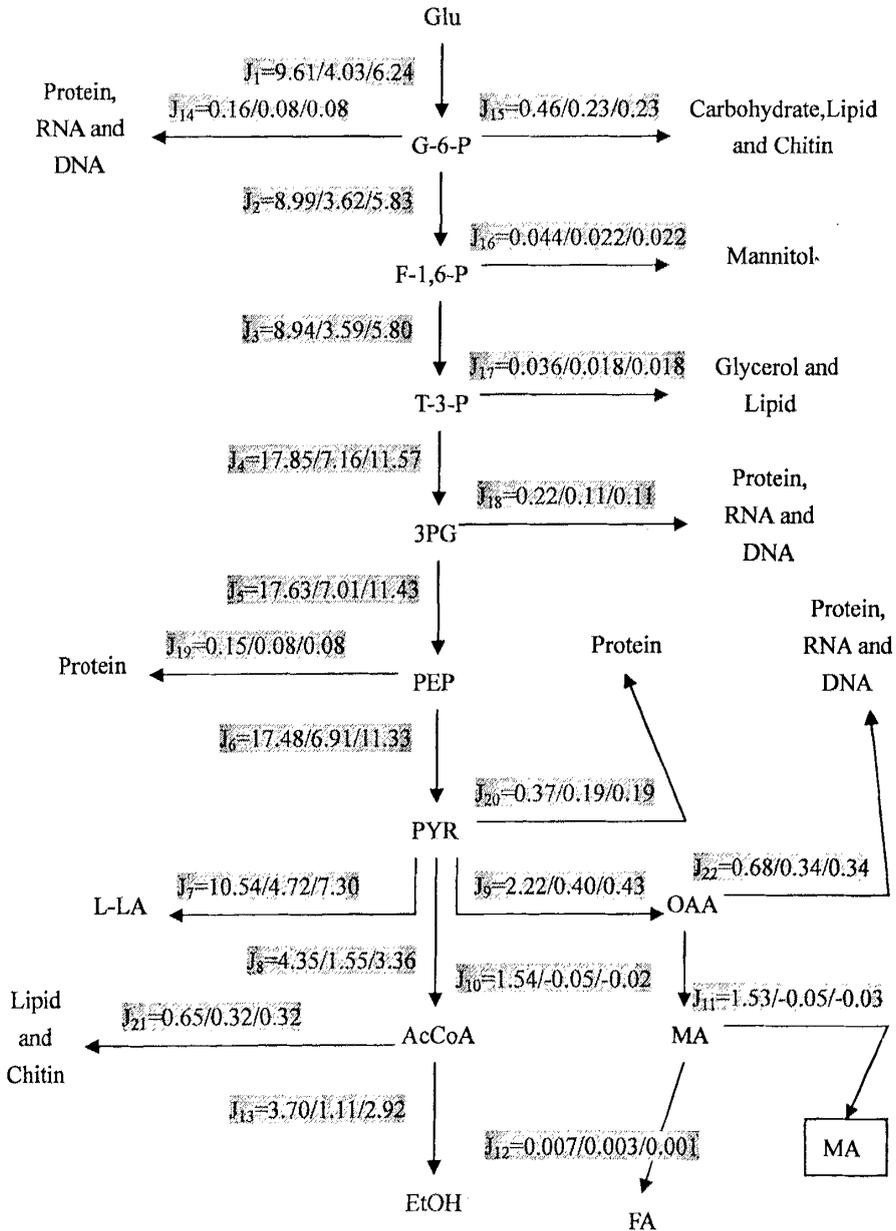


图 4-7 以 CaCO₃ 作为中和剂进行发酵的代谢通量分析

Fig.4-7 Metabolic flux distribution with CaCO₃ as a neutralizer

由图4-7可知，在菌体生长初期的第12h时，以CaCO₃作为中和剂的流量速率明显大于以NaOH溶液和氨水作为中和剂时的流量速率，可能是培养基中足量的Ca²⁺通过作用于细胞中的钙调素参与菌丝顶端生长的极性和菌丝分支形成的控制，促进菌体生长；且Ca²⁺可通过与细胞原生质膜相结合生成新的cAMP结合位点而强化糖酵解过程，可见Ca²⁺在米根霉菌体的生长和L-乳酸的生成过程中都起着重要作用。

以CaCO₃作为中和剂时，第12、30h、48h产物L-乳酸的流量速率分别是10.54mmol/g/h、4.72mmol/g/h、7.30mmol/g/h，显著大于以NaOH溶液和氨水作为中和剂时的流量速率，因此仅对于L-乳酸来说，CaCO₃是一种较NaOH溶液和氨水理想的中和剂。对于副产物富马酸和苹果酸来说，使用三种不同中和剂时的流量速率相差很大，但相对于L-乳酸来说，富马酸和苹果酸的产量很小。

4.4 本章小结

(1) 根据米根霉的生物化学信息及前人对米根霉生理学的研究，参考米曲霉的菌体组成建立了米根霉胞内主要代谢网络。

(2) 分析了米根霉As3.819在使用NaOH溶液、氨水和CaCO₃三种不同中和剂下进行分批发酵的不同阶段的通量分布情况。比较得出，L-乳酸的流量速率大小为：CaCO₃>氨水>NaOH溶液，因此就L-乳酸的产量来说，CaCO₃是较为理想的中和剂，但综合考虑下游L-乳酸分离纯化，氨水不失为一种较好的选择。

第五章 结论与展望

本文对三种不同中和剂CaCO₃粉末、NaOH溶液、氨水溶液中和米根霉发酵产生的L-乳酸进行了研究，优化出了三种不同中和剂的培养基组成，确定了米根霉发酵产L-乳酸的最适pH值以及三种不同中和剂的最佳浓度，实现了NaOH溶液、氨水溶液作为中和剂的半连续发酵，并构建了米根霉As3.819主要代谢通路，对CaCO₃粉末、NaOH溶液、氨水溶液作为中和剂不同阶段的发酵过程进行了代谢通量分析。

5.1 结论

1. 通过单因素和正交试验考察了分别以碳酸钙、NaOH、NH₃·H₂O作为中和剂的培养基组成：

(1) 以CaCO₃作为中和剂的最优培养基组成为：葡萄糖120g/L，(NH₄)₂SO₄ 4.0g/L，KH₂PO₄ 0.15g/L，NaH₂PO₄ 0.20g/L，ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L，MgSO₄·7H₂O 0.35g/L，CaCO₃ 60g/L。

(2) 以NaOH溶液作为中和剂的最优培养基组成为：葡萄糖120g/L，(NH₄)₂SO₄ 4.0g/L，MgSO₄·7H₂O 0.35g/L，ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L，NaH₂PO₄ 0.10g/L，KH₂PO₄ 0.15g/L。

(3) 以氨水作为中和剂的最优培养基组成为：葡萄糖120g/L，(NH₄)₂SO₄ 1.0g/L，MgSO₄·7H₂O 0.35g/L，ZnSO₄·7H₂O 0.22g/L，NaH₂PO₄ 0.15g/L，KH₂PO₄ 0.15g/L。

2. 通过罐发酵得出米根霉发酵产L-乳酸的最适pH值为5.5±0.2。流加不同浓度NaOH溶液和氨水溶液控制发酵液pH在5.5±0.2进行罐发酵72h，通过检测发酵液中的L-乳酸含量，得到最适NaOH溶液和氨水浓度分别为10mol/L、25%，此时L-乳酸产量分别为74.34g/L、80.61g/L。通过摇瓶发酵试验得出在葡萄糖浓度为120g/L条件下最佳CaCO₃添加量为60g/L，在7L发酵罐下发酵54h，得到L-乳酸浓度为75.80g/L。

3. 三种单一中和剂NaOH溶液、氨水、CaCO₃的发酵强度分别为1.03g/(L·h)、1.12g/(L·h)、1.40g/(L·h)，糖转化率分别为61.95%、67.18%、63.17%；而NaOH溶液和CaCO₃的复合中和剂、氨水和CaCO₃复合中和剂的发酵强度皆为1.18g/(L·h)，糖转化率分别为70.64%、71.02%，可见复合中和剂的发酵强度较单一中和剂NaOH溶液和氨水大，较CaCO₃小，但是复合中和剂的糖转化率较任何一种单一中和剂高。

4. 流加NaOH溶液、氨水进行半连续发酵，实现了液体中和剂的半连续发酵。以NaOH溶液作为中和剂时，首批发酵的L-乳酸产量为75.34g/L，发酵强度为1.05g/(L·h)，糖转化率为62.78%，综合计算7批次L-乳酸平均发酵强度为1.53

g/(L·h)。以氨水作为中和剂时，首批发酵的L-乳酸产量为80.45g/L，发酵强度为1.12g/(L·h)，糖转化率为67.04%，综合计算7批次L-乳酸平均发酵强度为1.65 g/(L·h)。因此，利用半连续发酵显著提高了L-乳酸的发酵强度，提高了菌体的利用率。

5. 根据米根霉的生物化学信息以及前人对米根霉生理学的研究，参考米曲霉的细胞组成，基于化学计量平衡方程，构建了米根霉As3.819代谢网络模型；应用代谢通量分析法，得到了以10mol/L NaOH溶液、25%氨水、60g/L CaCO₃作为中和剂的不同发酵阶段As3.819的胞内代谢通量分布。

5.2 展望

1. 以NaOH溶液和氨水作为中和剂时，产酸强度较低，虽然通过半连续发酵相对提高了，但有待于进一步提高。

(1) CaCO₃是一种缓慢温和型的酸中和剂，对米根霉菌体的伤害很小，但NaOH和氨水溶液碱性较强，且不断流加使得发酵罐内Na⁺和NH₄⁺不断增多，对米根霉菌体伤害较大。因此可以通过先进的改造菌株的方法，定向选出耐碱耐钠或耐碱耐氨菌体进行发酵，可以有效减低Na⁺和NH₄⁺对米根霉菌体的伤害，从而提高L-乳酸生产率。

(2) 改进发酵设备，优化提取工艺，加强技术改造，设计新型、高效的发酵反应器，能够简便的控制反应条件，以适应连续发酵或半连续发酵过程，还可通过反应过程的设计和参数优化，达到提高L-乳酸生产率的母的；同时完善提取和精制工艺，降低生产成本，提高收率和产品档次。

2. 对米根霉As3.819丙酮酸主要分支酶的特性进行进一步研究，使之对发酵工艺条件控制起理论指导作用，并通过代谢通量分析的方法，进一步了解丙酮酸分支点的调控机理；根据Gene Bank公布的LDH、PDC，采用PCR技术直接扩增出该基因（LDH与PDC基因都无内含子，可直接扩增）；采用RT-PCR技术得到PC基因，在体外采用删除、插入、取代等方法进行定向突变后，再通过同源重组或定位整合技术，将突变基因转移至染色体DNA中；检测基因定向突变后酶活变化，对丙酮酸分支点进行MCA分析；研究定向突变菌株的能量流、生长情况及发酵性能。通过上述研究的开展，为最终建立2-3种可用于实际生产的细胞代谢调控新方法提供指导。

参考文献

- [1] 金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997
- [2] 杨萍. L-乳酸的生产及其应用研究[J]. 科技信息, 2008, 2: 56-63
- [3] 凌关庭. 食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 第三版, 2003
- [4] 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007
- [5] 洪安安, 刘灿明, 刘德华. L-乳酸的微生物发酵[J]. 化学工程与装备, 2008, 2: 56-63
- [6] Yu R C, Hang Y D. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L-(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*[J]. Biotechnology Letters, 1989, 11(8): 597-600
- [7] 钱志良, 胡军, 雷肇祖. 乳酸的工业化生产、应用和市场[J]. 工业微生物, 2001, 31 (2): 49-53
- [8] 曹本昌, 徐建林. L-乳酸研究综述[J]. 食品与发酵工业, 1993, 18(3): 56-61
- [9] 赵鑫, 赵良启, 谢红. 发酵生产 L-乳酸的现状与展望[J]. 山西化工, 2005, 25(1): 15-19
- [10] 赵宏宇, 赵靖, 郑春丽. 米根霉乳酸发酵的研究进展[J]. 天津化工, 2007, 21(1): 7-9
- [11] 王宏伟, 郭绍华, 冯靓. L-乳酸发酵的研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2004(4): 28-30
- [12] 徐忠, 汪群慧, 姜兆华. L-乳酸的制备及其应用的研究进展[J]. 化学与粘合, 2004(4): 214-217
- [13] 穆杂文. 国内外乳酸及其衍生品的应用和市场情景[J]. 化工技术经济, 2001(3): 107-114
- [14] Data R. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1995(16): 221-231
- [15] Niju N, Roychoudhury P K, Srivastave A. L-(+)lactic acid fermentation and its product polymerization[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2004(8): 167-179
- [16] 钱志良, 胡军, 雷肇祖. 乳酸的工业化生产、应用和市场[J]. 工业微生物, 2001, 31 (2): 49-53
- [17] 王立梅, 齐斌. L-乳酸应用及生产技术研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 608-612
- [18] 胡艳红. 米根霉发酵产L-乳酸耐高温菌株的选育及发酵条件优化[D]. 合

- 肥工业大学，合肥：2007
- [19] 梁诚. 乳酸生产、应用及市场前景[J]. 广西化工，2001，29(6): 37-39
- [20] Mokhtar M, El-Baseir Ian W, Kellaway. Poly (L-lactic acid) microspheres for pulmonary drug delivery: release kinetics and aerosolization studies[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1998, 175: 135-145
- [21] 杨惠娣. 生物降解性塑料开发的现状与发展趋势[J]. 中国塑料，1996，10(4): 1-9
- [22] 白冬梅. L-乳酸高产菌株的诱变选育及其代谢通量分析[D]. 天津大学，天津：2001
- [23] Rathin Datta et al. The technology and economy potential of poly (lactic acid) and its ramification[J], FEMS Microbiology Reviews, 1995, (16): 221-231
- [24] Peimin Yin, Naoki Nishina, Yuuko Kosakai et al. Enhanced production of L-(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift Bioreactor[J], J.Ferment.Bioeng, 1997, 84: 249-253.
- [25] David P. Mobley, *Plastics from Microbes*, Hanser/Gardner Publications, Inc, Cincinnati Munich Vienna New York, 1994, 93-137
- [26] 曹本昌，徐建林. L-乳酸研究综述[J]. 食品与发酵工业，1993，18(3): 56-61
- [27] 杨虹，林宇野，史美榕. 产L-乳酸的丝状真菌的研究[J]. 微生物学通报，1994，21(6): 339-342
- [28] 虞东胜，周晓燕，王健. 米根霉发酵生产 L-乳酸[J]. 工业微生物，2000，
- [29] 白冬梅，赵学明，胡宗定. 从地表土中筛选根霉乳酸菌的研究[J]. 化学工业与工程，2001，18(6): 407-410
- [30] Bai D M, Zhao X M. Strain Improvement of *Rhizopus oryzae* for Over-production of L-(+)-lactic acid and Metabolic Flux Analysis of Mutants[J]. Biochemical Engineering, 2003: 1-8
- [31] Obayshi A, Yorifugi H, Yamagata T. Respiration in Organic Acid Forming Molds. Part I Purification of Cytochrome c, coenzyme Q9 and L-lactic Dehydrogenase from Lactate Forming *Rhizopus Oryzae*[J]. Agric Biol Chem, 1966, 30: 717-724
- [32] Prichard G G. An NAD⁺-Independent L-Lactate Dehydrogenase From *Rhizopus Oryzae*[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1971, 250: 25-34
- [33] Prichard G G. Factors Affecting the Activity and Synthesis of NAD⁺-dependent L-Lactate Dehydrogenase in *Rhizopus Oryzae*[J]. J of General Microbiology, 1973, 78: 125-137
- [34] Skory C D. Isolation and Expression of Lactate Dehydrogenase Genes from *Rhizopus Oryzae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 6:

2343-2348

- [35] Hakki E E, Akkaya M S. RT-PCR amplification of *Rhizopus Oryzae* Lactate Dehydrogenase gene fragment[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28: 259-264
- [36] Skory C D. Lactic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae* Expressing a *Rhizopus oryzae* Lactate Dehydrogenase gene[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30: 22-27
- [37] Skory C D. Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae* Transformants with Modified Lactate Dehydrogenase Activity[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003
- [38] 王蓉, 王远亮, 陈国平. 米根霉发酵生产L(+)-乳酸研究进展[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2004, 27(12): 95-97
- [39] 曾炜, 陈丰秋, 詹晓力. 乳酸的生产技术及其研究进展[J]. 化工进展, 2006, 25(7): 744-749
- [40] 乔长昂, 汤凤霞, 贾士儒. L-乳酸高产突变株米根霉NAF-032[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(5): 459-465
- [41] P Bai D M, Jia M Z, Zhao X M. L(+)-lactic Acid Production by Pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a Stirred Tank Fermentor[J]. Chemical Engineering Science, 2003, 58: 785-791
- [42] Bai D M, Zhao X M, Li X G. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18: 41-48
- [43] 闫征, 王昌禄, 顾晓波. pH值对乳酸菌生长和乳酸产量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2002, 29(6): 35-37
- [44] 徐国谦, 储炬, 王永红. 不同的中和剂对L(+)-乳酸发酵的影响[J]. 工业微生物, 2007, 4(37): 1-5
- [45] 史高峰, 王国英. L-(+)-乳酸发酵与分离技术研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 547-550
- [46] 陆玲, 袁生. 真菌顶端生长菌丝内CaM的免疫组化定位[C]//中国菌物学会论文摘要, 1993: 176
- [47] 裘维蕃. 菌物学大全[M], 北京: 科学出版社, 1998
- [48] 匡群, 孙梅, 施大林. 耐氨米根霉发酵生产L-乳酸的研究[J]. 生物技术, 2005, 4(15): 65-67
- [49] 孙梅, 匡群, 施大林. 耐氨米根霉的分批补料发酵及发酵动力学初探[J]. 食品与发酵工业, 2005, 12(31): 30-34
- [50] 白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 玉米生粉发酵生产L-乳酸的研究[J]. 化学工程,

- 2002, 30 (3): 50 -54
- [51] Tiejun Liu, Shigenobu Miura, Tomohiro Arimura. Evaluation of L-Lactic Acid Production in Batch, Fed-batch, and Continuous Cultures of *Rhizopus* sp. MK-96-1196 Using an Airlift Bioreactor[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2005, 10: 522-527
- [52] Tiejun Liu, Shigenobu Miura, Masaaki Yaguchi. Scale-Up of L-Lactic Acid Production by Mutant Strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 from 0.03m³ to 5 m³ in Airlift Bioreactors[J]. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2006, 1(101): 9-12
- [53] 张蓓. 代谢工程[M]. 天津: 天津大学出版社, 2003
- [54] Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering[J]. *Science*, 1991, 252: 1668-1681
- [55] 赵学明, 马红武, 班睿. 代谢工程的发展现状和未来[J]. *化学功臣*, 1997, 5(25): 57-59
- [56] 孔庆学, 李玲. 代谢工程中的MFA&MCA及其具体应用[J]. *天津农学院学报*, 2003, 10(3): 52-55
- [57] 金明杰, 黄和, 张昆. 应用代谢通量法分析花生四烯酸的合成过程[J]. *高校化学工程学报*, 2007, 2(71): 316-321
- [58] 卫功元, 李寅, 堵国成. 产阮假丝酵母分批发酵生产谷胱甘肽的代谢通量分析[J]. *化工学报*, 2006, 6(57): 1141-1147
- [59] 金明杰, 黄和, 刘欣. 花生四烯酸发酵动态代谢通量分析模型[J]. *化学与生物工程*, 2007, 6(24): 41-44
- [60] 金明杰, 黄和, 张昆. 应用代谢通量法分析花生四烯酸的合成过程[J]. *高校化学工程学报*, 2007, 2(71): 316-321
- [61] 张青瑞, 修志龙, 曾安平. 克雷伯氏杆菌发酵生产1,3-丙二醇的代谢通量优化分析[J]. *化工学报*, 2006, 6(57): 1103-1110
- [62] 刘朝辉, 齐崑, 何志敏. 地衣芽孢杆菌发酵生产 β -甘露聚糖酶的代谢通量分析[J]. *过程工程学报*, 2007, 7(6): 1163-1167
- [63] 赵学明, 马红武, 唐寅杰. 应用代谢通量法分析黄原胶发酵实验数据[J]. *高校化学工程学报*, 1997, 4(11): 394-399
- [64] 仝志明, 曹竹安. 杂交瘤细胞代谢流分析模型及在批式培养中的应用[J]. *无锡轻工大学学报*, 2001, 20(1): 11-15
- [65] Jorgensen.H, Nielsen.J, Villadwen.J. Metabolic flux distributions in *penicillium chrysogenum* during Fed-Batch Cultivation[J]. *Biotechnol bioeng*, 1995, 462: 119-131
- [66] Wright B E. Angelika Longacre and Jacqueline Reimers, Models of

- Metabolism in *Rhizopus oryzae*[J]. *J theor.Biol*, 1996, 182: 453-457
- [67] Longacre A. Jacqueline Reimers and James E. Gannon etc, Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields[J]. *J theor.Biol*, 1997, 21: 30-39
- [68] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1995
- [69] 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学(上册) [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1999
- [70] 曹友声. 现代工业微生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版, 1998
- [71] 郑志, 姜绍通, 潘丽军. 反相高效液相色谱法测定发酵液中乳酸的含量[J]. 食品科学[J], 2003, 12: 89-91
- [72] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [73] 郑志, 姜绍通, 罗水忠. 米根霉乙醇脱氢酶(ADH)突变菌株的诱变选育[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1): 24-27
- [74] Henrik pedersen, Morten carlsen, Jens Nielsen. Identification of Enzymes and Quantification of Metabolic Fluxes in the Wild Type and in a Recombinant *Aspergillus oryzae* Strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 11-19
- [75] Mariet J, Guettler MV, Mahendra KJ. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp 130Z[J]. *Arch Microbiol*, 1997, 167: 332-342
- [76] McKinlay JB, Shachar HY, Zeikus JG. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of C-13-labeled metabolic product isotopomers[J]. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 177-192
- [77] 潘丽军, 李兴江, 姜绍通. 基于代谢通量分析的琥珀酸放线杆菌高产选育研究[J]. 生物工程学报, 24(9): 1595-1603